



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 40 092 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
A 61 K 9/127
A 61 K 48/00
C 12 N 15/88

⑲ Aktenzeichen: 197 40 092.2
⑳ Anmeldetag: 12. 9. 97
㉑ Offenlegungstag: 18. 3. 99

DE 197 40 092 A 1

⑦1 Anmelder:
Hengge, Ulrich, Dr.med., 45133 Essen, DE

⑦4 Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

⑤6 Entgegenhaltungen:
WO 97 10 851
WO 97 07 784
J. Controlled Release 1997, 43 (2,3) 251-9;
Skin Pharmacol. 1990, 3, 21-28;
Antimicrob. Agents Chemother. 1990,34(1)
S.107-10;
Clin. Invest. 1993, 71(8), 649-53;
Int. J. Pharm 1996, 127(1), 1-7;
Colloids Surf. A 1996, 113(3), 259-67;
J. Liposome Res., 1994, 4(1), 93-106;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Liposomen und Verfahren zur Transfektion von Zellen

⑤7 Die Erfindung betrifft Liposomen umfassend eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, wobei die chemische Zusammensetzung der Lipidphase der einer Hautschicht entspricht und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt, sowie ein Verfahren zur Herstellung derartiger Liposomen. Des weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Transfektion von Zellen, wobei die zu transfizierenden Zellen mit den erfindungsgemäßen Liposomen in Kontakt gebracht werden. Des weiteren betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung und ein Mittel zur topischen Verabreichung, welche/welches einen Gehalt an den erfindungsgemäßen Liposomen aufweist sowie Verwendungen der erfindungsgemäßen Liposomen, der pharmazeutischen Zusammensetzung und des erfindungsgemäßen Mittels.

DE 197 40 092 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Liposomen umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, ein Verfahren zu deren Herstellung sowie daraus herstellbare Liposomen, Verfahren zur Transfektion von Zellen, Mittel zur topischen Verabreichung sowie Verwendungen der Liposomen und Mittel.

Mit dem zunehmenden Verständnis biologischer Zusammenhänge auf molekularer Ebene etablierte sich in der jüngsten Vergangenheit die molekulare Medizin, die die Entwicklung neuer Therapiekonzepte und Medikamente maßgeblich beeinflusst. Dies gilt auch für die Haut, deren Funktion weit über die offensichtliche Barrierefunktion hinausgeht und deren Erkrankungen in ganz besonderem Maße in vielen Fällen im wahrsten Sinne des Wortes offensichtlich sind.

Eine Möglichkeit der Behandlung von Erkrankungen der Haut wird in der Insertion und Expression von Genen in der Epidermis gesehen, d. h. der Genthherapie der die Epidermis ausbildenden Zellen. Besonders bedeutsam sind hierbei die Keratinozyten.

In der Technik sind verschiedene Verfahren bekannt, Keratinozyten in situ zu transfizieren. Eine Möglichkeit stellt die intradermale Injektion dar, bei es zur lokalen Transfektion, d. h. Expression des eingebrachten genetischen Materials in einem sehr eng umgrenzten dermalen Areal kommt. Typischerweise ist die Expression transient für 2 bis 7 Tage und es erfolgt keine Integration des applizierten genetischen Materials in das Genom der Keratinozyten. Ein entscheidender Nachteil dieser Technik besteht darin, daß eine entsprechende Transfektion auf den unmittelbaren Injektionsbereich beschränkt ist und es sich dabei um ein invasives Verfahren handelt, daß nur von qualifiziertem Personal unter geeigneten Hygienebedingungen zur Anwendung gelangen kann.

Ebenfalls auf die lokale Applikation von Genmaterial beschränkt ist die Verwendung von Mikroprojektilen, die aus mit DNA beschichteten mikroskopischen Goldpartikeln bestehen und mittels einer sogenannten Genkanone direkt in die Zellen eingebracht werden. Auch dieses Verfahren ist mit einer Reihe von Nachteilen verbunden, die zum einen aus der Verwendung der vergleichsweise teuren Goldpartikel sowie dem erforderlichen Beschichtungsschritt resultieren, zum anderen jedoch auch in der Verwendung der Genkanone bestehen, die einen nicht unerheblichen apparativen Aufwand darstellt, ebenfalls qualifiziertes Personal zu seiner Bedienung benötigt und darüber hinaus nicht den gewünschten Erfolg liefert.

Schließlich sind in der Technik noch topische Verfahren bekannt, bei denen komplexiert vorliegende DNA direkt in die die Epidermis aufbauenden Zellen eingebracht werden soll. So wurden beispielsweise kationische Lipide, die sich an die anionische DNA lagern, ebenso verwendet wie die Rezeptor-vermittelte Endozytose. Dabei blieb der erstgenannte Ansatz in der praktischen Anwendung erfolglos. Der zweite Ansatz, beispielsweise in Form der Transferrininfektion, ist aufgrund der immunogenen Bestandteile (es werden Dissoziationsproteine von Adenovirus oder des hämagglutinierenden Virus von Japan verwendet) immunogen und kann somit nur einige Male erfolgreich appliziert werden.

Schließlich sind in der Technik noch die aus der Kosmetologie bekannten Liposomen beschrieben, die in der wäßrigen Innenphase die Plasmid-DNA enthalten. Auch dieser Ansatz führte nur bei einem kleinen Prozentsatz der Zellen zur erfolgreichen Transfektion.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Liposomen bereitzustellen, die eine hohe Transfektionsrate von Hautzellen, und insbesondere Keratinozyten, erlauben.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von Verfahren zur Herstellung von derartigen Liposomen. Schließlich liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Transfektion von Zellen, und insbesondere Keratinozyten, zur Verfügung zu stellen, welches eine hohe Transfektionsrate erlaubt.

Der Erfindung liegt auch die Aufgabe zugrunde, eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitzustellen, die die gegenüber dem Stand der Technik verbesserte Applikation von Wirkstoffen, insbesondere die topische Applikation derselben, erlaubt.

Weiterhin liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, Mittel zur topischen Verabreichung chemischer Verbindungen bereitzustellen.

Des weiteren sollen erfindungsgemäß Mittel zur Genthherapie von Hautzellen, zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen der Haut, einschließlich von Warzen, von systemischen Erkrankungen und von Alopezie sowie Mittel zur Immunisierung offenbart werden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch Liposomen umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, wobei die chemische Zusammensetzung der Lipidphase der einer Hautschicht entspricht und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch Liposomen umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, wobei das Liposom betreffend der Lipidklassen folgende Komponenten umfaßt:

Phospholipide	< 2 Gew.-%
Cholesterolsulfat	2 Gew.-%
Freie Fettsäuren	20 Gew.-%
Ceramide	20 Gew.-%
Sterole	43 Gew.-%
Triacylglycerole (Neutralfette)	4 Gew.-%
Sterolester	9 Gew.-%

und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle

oder Strukturen umfaßt.

Weiterhin wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, wobei vorgesehen ist, daß a) Stratum corneum-Lipid gewonnen wird und b) aus dem Stratum corneum-Lipid unter Ultraschallbehandlung und/oder Detergenz-dialyse Liposomen hergestellt werden.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch Liposomen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbar sind. 5

Desweiteren wird die Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Transfektion von Zellen gelöst, wobei die zu transfizierenden Zellen mit den erfindungsgemäßen Liposomen in Kontakt gebracht werden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe auch durch eine pharmazeutische Zusammensetzung gelöst, die die erfindungsgemäßen Liposomen und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.

Desweiteren wird die Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Mittel zur topischen Verabreichung chemischer Verbindungen gelöst, wobei das Mittel einen Gehalt an erfindungsgemäßen Liposomen aufweist. 10

Schließlich wird die Aufgabe gelöst durch Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen, der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Mittels zur Genterapie von Hautzellen.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen, der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Mittels zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen der Haut, einschließlich der Behandlung von Warzen, systematischen Erkrankungen und von Alopezie sowie Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen, der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Mittels zur Immunisierung eines Wirtsorganismus. 15

Auch wird die Aufgabe gelöst durch einen Impfstoff, der einen Gehalt an den erfindungsgemäßen Liposomen aufweist, wobei die Liposomen Nukleinsäure, die die genetische Information für ein interessierendes Antigen umfaßt, oder Nukleinsäure umfassen, die die genetische Information für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment umfaßt, wobei der Antikörper bzw. das Antikörperfragment spezifisch für das interessierende Antigen ist. 20

Bei dem eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase umfassenden Liposom bei dem die chemische Zusammensetzung der Lipidphase der einer Hautschicht entspricht, kann vorgesehen sein, daß die Hautschicht humane Epidermis ist. 25

In einer weiteren Ausführungsform kann vorgesehen sein, daß die Hautschicht das Stratum corneum ist.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Liposomen kann vorgesehen sein, daß Stratum corneum-Lipid gewonnen wird, indem Stratum corneum enzymatisch und/oder mechanisch von der Haut abgetragen wird und anschließend in Methanol/Chloroform extrahiert wird.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Liposoms kann vorgesehen sein, daß die intraliposomale Phase eine wäßrige Phase ist. 30

Desweiteren kann vorgesehen sein, daß die intraliposomale Phase mindestens eine chemische Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt.

Darüber hinaus kann vorgesehen sein, daß die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Wachstumsfaktoren, Antibiotika, schmerzlindernde Agenzien, Agenzien, die die Zellteilung und/oder die Vaskularisierung beeinflussen, koagulierende und anti-koagulierende Agenzien, Cytokine, chemisches Attraktans, Enzyme, und Kombinationen davon umfaßt. 35

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist die chemische Verbindung eine Nukleinsäuresequenz.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Transfektion von Zellen kann vorgesehen sein, daß die zu transfizierenden Zellen Hautzellen sind. 40

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Hautzellen ausgewählt aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Zellen im erfindungsgemäßen Verfahren zur Transfektion Keratinozyten der Haarfollikel sind. 45

In anderen, ganz besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Zellen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Transfektion epidermale Langerhans-Zellen.

Bei dem erfindungsgemäßen Mittel zur topischen Verabreichung chemischer Verbindungen kann vorgesehen sein, daß das Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, die Cremes, Salben, Gele, Sprühpflaster und Tinkturen umfaßt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mittels ist vorgesehen, daß das Mittel weiterhin einen Gehalt an mindestens einer Verbindung aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Permeabilitätsverstärker und Quellmittel umfaßt. 50

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der hierin offenbarten Liposomen, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels zur Genterapie von Hautzellen kann vorgesehen sein, daß die Hautzellen in situ vorliegen.

In einer alternativen Ausführungsform der obigen erfindungsgemäßen Verwendung kann vorgesehen sein, daß die Hautzellen ex vivo vorliegen. 55

Weiterhin kann bei der vorgenannten Verwendung vorgesehen sein, daß die Hautzellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Hautzellen Keratinozyten der Haarfollikel sind.

Weiterhin kann in einer Ausführungsform der obigen erfindungsgemäßen Verwendung vorgesehen sein, daß die Hautzellen epidermale Langerhans-Zellen sind. 60

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der hierin offenbarten Liposomen, der hierin offenbarten pharmazeutischen Zusammensetzung oder des hierin offenbarten Mittels zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen der Haut ist in einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, daß die Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die genetische Hauterkrankungen, Psoriasis, Hauttumoren und Wunden umfaßt. 65

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß die genetische Hauterkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Epidermolysis bullosa simplex, Epidermolysis hyperkeratosis, palmoplantare Keratose, funktionale Epidermolysis bullosa, dystrophe Epidermolysis bullosa, lamellare Ichthyose und Xeroderma pigmentosum umfaßt.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der hierin offenbarten Liposomen, der hierin offenbarten pharmazeutischen Zusammensetzung oder des hierin offenbarten Mittels zur Behandlung systemischer Erkrankungen ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, daß die systemische Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Hämophilie A und Hämophilie B sowie Kollagendegeneration umfaßt.

- 5 Bei der erfindungsgemäßen Verwendung der hierin offenbarten Liposomen, der hierin offenbarten pharmazeutischen Zusammensetzung oder des hierin offenbarten Mittels zur Immunisierung eines Wirtsorganismus ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, daß der Wirtsorganismus ein menschlicher Organismus ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, daß mit den erfindungsgemäßen Liposomen eine besonders hohe Transfektionsrate von Hautzellen, und insbesondere von Keratinozyten, erreicht werden kann. Dieser Effekt scheint durch den hohen Grad an Hydrophobizität der Liposomenhülle, d. h. deren Lipidzusammensetzung, bedingt zu sein. DNA, die in den erfindungsgemäßen Liposomen enkapsuliert vorliegt, kann die epidermale Barriere der Haut überwinden und in den tieferen Schichten der Epidermis aufgenommen und exprimiert werden.

Die vorgehend beschriebene Passagefähigkeit der erfindungsgemäßen Liposomen erlaubt darüberhinaus auch eine Freisetzung von in den Liposomen enthaltenen Verbindungen oder Wirkstoffen, einschließlich Nukleinsäuren, in tieferen Schichten der Epidermis bzw. der Haut, was sowohl unter dem Aspekt der Verabreichung pharmazeutisch wirksamer Verbindungen wie auch unter dem Aspekt der kosmetischen Behandlung der Haut von Vorteil ist.

Dabei ist ganz besonders beachtlich, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen bzw. der hierin offenbarten Mittel und Verfahren die Nukleinsäure-Applikation mehrmals wiederholbar ist und es nicht zum Auftreten einer Immunantwort, insbesondere einer solchen gegen nackte Nukleinsäure gerichtete kommt, was gegenüber anderen Transfektionstechniken einen erheblichen Vorteil darstellt.

Infolge der hohen Transfektionsrate wird es erstmalig möglich, einfach und zuverlässig viele Hautzellen zu transfizieren und somit die Grundlage dafür zu legen, die der Genthherapie der Haut inhärenten Vorteile tatsächlich zu realisieren.

Diese Vorteile bestehen unter anderem darin, daß, neben einer in der Regel kausalen Therapie, das die therapierten Zellen aufweisende Gewebe im Falle unerwünschter Nebenwirkungen leicht entfernt werden kann und weiterhin infolge der Tatsache, daß eine ektope Expression der mittels der erfindungsgemäßen Liposomen eingeschleusten Nukleinsäure ausgeschlossen werden kann, die Therapie als solche jederzeit unterbrochen werden kann.

Darüber hinaus sind insbesondere die Keratinozyten vergleichsweise leicht zu gewinnen sowie in Kultur zu expandieren und es sind in der Technik auch Verfahren und Mittel bekannt zur Modulation der Expression einer in Keratinozyten vorhandenen Nukleinsäuresequenz.

Die intraliposomale Phase kann eine wäßrige Phase sein, wobei vorgesehen sein kann, daß diese ein spezielles Milieu, gestaltet durch den Zusatz bestimmter Verbindungen, aufweist. Die wäßrige Phase kann so beispielsweise einen distinkten pH-Wert, einen bestimmten Puffer, oder Ionenkonzentrationen aufweisen, die die Stabilität, Konformation und biologische Wirksamkeit der darin enthaltenen – chemischen – Verbindung(en) beeinflußt und somit für den Fall, daß in der intraliposomalen Phase ein zur Transfektion geeignetes Nukleinsäurekonstrukt vorhanden ist, auf die Transfektionsrate der mit den erfindungsgemäßen Liposomen behandelten Zellen einwirken. Die Gestaltung eines entsprechenden Milieus, um die genannten Effekte zu erreichen, sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt.

Bei den in der intraliposomalen Phase enthaltenen chemischen Verbindungen handelt es sich um solche, bei denen eine chemische Bindung zwischen mindestens zwei Atomen besteht und umfassen entsprechend auch biochemische bzw. biologische Verbindungen.

Unter niedermolekulare Verbindungen sollen hierin solche verstanden werden, die ein Molekulargewicht von weniger als 10 000 aufweisen und insbesondere solche, die Kohlenstoff enthalten. Derartige Verbindungen sollen auch Carbonsäuren, Aminosäuren, Kohlenhydratmonomere, Lipide, einschließlich Steroide, Lactame, Lactone und andere einschließen. Unter Proteinen sollen hierin auch Peptide und allgemein Polymere von mindestens zwei peptidisch miteinander verbundenen Aminosäuren verstanden werden.

Unter Nukleinsäure bzw. Nukleinsäuresequenz sollen hierin sowohl DNA als auch RNA verstanden werden. Die Nukleinsäure(-Sequenz) kann sowohl nackt als auch komplexiert/assoziiert vorliegen. Desweiteren ist möglich, daß die Nukleinsäure(-Sequenz) als Einzelstrang, Doppelstrang oder als Triplet vorliegt. Die Nukleinsäuresequenz kann auch ein Ribozym sein oder eine antisense Nukleinsäure. Desweiteren kann sie sowohl natürlich vorkommend sein als auch rekombinant. Die Nukleinsäure(-Sequenz) kann weitergehende Elemente umfassen, die sowohl ihre Transkription als auch Translation und ihre Stabilität beeinflussen. So kann sie beispielsweise Promotoren, zellspezifische ebenso wie induzierbare, Terminatoren und weitergehende regulatorische Elemente wie beispielsweise Enhancer umfassen. Schließlich kann die Nukleinsäure(-Sequenz) auch Elemente umfassen, die die Insertion der Nukleinsäure(-Sequenz) in das Chromosom einer transfizierten Zelle erlauben, oder aber auch Elemente, die verhindern, daß es zu einer Insertion der Nukleinsäure(-Sequenz) in das zelluläre Genom kommt. Letzteres kann beispielsweise dann besonders erwünscht sein, wenn lediglich eine transiente Expression der transfizierten Nukleinsäure(-Sequenz) erwünscht ist.

Grundsätzlich kann die Nukleinsäure(-Sequenz) so gestaltet vorliegen, daß sowohl auf der RNA-Ebene als auch der Translations- und Transfektions-Ebene die erwünschte Wirkung erzielt wird. Die hierzu in der Nukleinsäure(-Sequenz) selbst vorzunehmenden Maßnahmen bzw. die Gestaltung eines Milieus, innerhalb dessen die Nukleinsäure(-Sequenz) die entsprechenden Eigenschaften oder Wirkungen aufweist, wie beispielsweise eine spezielle Konfiguration wie die Z-Konfiguration, sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt.

Unter Nukleinsäure sollen hierin auch Oligonukleotide verstanden werden, einschließlich antisense-Oligonukleotide zur Steuerung der Transkription und/oder Translation von in Zellen vorhandenen Nukleinsäuresequenzen.

Die Transfektion von Zellen mittels Liposomen ist dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Transfektion von Zellen ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen sowohl für den Fall von Vorteil, daß die Zellen, ausgewählt aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt, bzw. Keratinozyten der Haarfollikel bzw. epidermale Langerhans-Zellen, in vivo als auch für den Fall, daß die vorgenannten Zellen ex vivo transfiziert werden.

Aus dem oben Gesagten ergibt sich, daß die den erfindungsgemäßen Liposomen inhärenten Vorteile auch und beson-

ders dann realisiert werden können, wenn diese in einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten sind.

Es wurde überraschend gefunden, daß unter Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen sich allgemein pharmazeutische Zusammensetzungen und insbesondere Mittel zur topischen Verabreichung chemischer Verbindungen herstellen lassen, die in besonders effektiver Weise eine Freisetzung der in der intraliposomalen Phase enthaltenen chemischen Verbindungen in die Zelle bzw. die tieferen Schichten der Epidermis und der Dermis ermöglichen. In einem weiteren Aspekt wird darüber hinaus auch möglich, eine spezielle Form der Depotverabreichung der in den Liposomen enthaltenen chemischen Verbindungen zu realisieren. 5

Unter pharmazeutisch akzeptablem Träger werden, unter anderem, Wasser, Pufferlösungen und dergleichen verstanden. Dies schließt hierin insbesondere auch jene den Fachleuten bekannten Träger ein, die bei der Herstellung topischer Applikationsformen wie Cremes, Salben, Gele, Sprühpflaster und Tinkturen verwendet werden. 10

Unter chemischen Verbindungen sollen die hierin oben definierten Verbindungen verstanden werden und schließen insbesondere die dort, wenngleich nicht abschließend, beschriebenen Nukleinsäuren ein.

Die hierin offenbarten Mittel stellen letztendlich Ausführungsformen der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung dar.

Sowohl die hierin beschriebene pharmazeutische Zusammensetzung als auch die Mittel zur topischen Verabreichung können darüber hinaus noch mindestens einen Wirkstoff enthalten, der nicht in den darin enthaltenen Liposomen vorliegt. 15

Das Mittel zur topischen Verabreichung selbst kann dabei ausgebildet sein als Creme, Salbe, Gel, Sprühpflaster oder Tinktur. Diese Mittel erlauben die Aufnahme der erfindungsgemäßen Liposomen in eine Matrix, die dann, typischerweise auf die Haut, aufgetragen wird und – ggf. nach einer Einwirkzeit – den Kontakt zwischen Zelle und Liposom ermöglicht. Durch die Verteilung der Liposomen in besagter Matrix läßt sich somit – statistisch – auch die Transfektionshäufigkeit einer einzelnen Zelle regulieren. 20

Die obengenannten topischen Verabreichungsformen erlauben darüber hinaus, daß ein vergleichsweise großes Areal der Haut entsprechend behandelt wird, d. h. wenn in der intraliposomalen Phase Nukleinsäuresequenzen vorhanden sind, ein großes Areal von Hautzellen transfiziert werden kann. Die Transfektion, insbesondere in ihrer klinischen Anwendung, ist dann besonders einfach durchführbar, ohne daß hierfür besonders qualifiziertes Personal oder besondere hygienische Bedingungen erforderlich wären. 25

Die erfindungsgemäßen Mittel können hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, Handhabbarkeit und Stabilität durch Modifikation der die Matrix derselben ausbildenden Verbindungen in für den Fachmann auf diesem Gebiet bekannten Art und Weise ausgebildet werden. Dies schließt den Zusatz weiterer, für die Ausbildung von Cremes, Salben, Gelen, Sprühpflaster und Tinkturen üblichen Zusätzen ein. 30

Sowohl die Liposomen als solche als auch die sie enthaltenden erfindungsgemäßen Mittel sind besonders vorteilhaft in der Gentherapie von Hautzellen aufgrund der durch sie erreichbaren Transfektionsraten zu verwenden. Dabei ist es möglich, daß die entsprechenden Hautzellen, und insbesondere die humanen Keratinozyten, einschließlich derjenigen der Haarfollikel, sowie die epidermalen Langerhans-Zellen, in situ, d. h. als Teil der Hautoberfläche des Patienten, vorliegen, aber es ist auch eine ex vivo Gentherapie möglich, wenn die Hautzellen oder Hautgewebe, und auch hier wiederum speziell die humanen Keratinozyten, einschließlich derjenigen der Haarfollikel, sowie die epidermalen Langerhans-Zellen, in Kultur vorliegen. Es ist offensichtlich, daß bei der in situ Situation das erfindungsgemäße Mittel mit einem Gehalt an Nukleinsäure in der intraliposomalen Phase mit besonderen Vorteilen verbunden ist, wohingegen im Falle der ex vivo Gentherapie insbesondere die erfindungsgemäßen Liposomen die hierin offenbarten Vorteile im besonderen Maße aufweisen. 35 40

Insbesondere bei transientser Genexpression der mittels der erfindungsgemäßen Liposomen in die Hautzellen eingebrachten Nukleinsäure(-Sequenzen) ist eine einfache Wiederholung der Therapie sowie leichte Steuerung des Therapieumfanges durch eine entsprechende breitflächige topische Applikation des erfindungsgemäßen Mittels problemlos möglich. Insbesondere unter dem Aspekt der wiederholten Behandlung ist dabei beachtlich, daß gegen die solchermaßen in das biologische System, beispielsweise die menschliche Haut, eingebrachte Nukleinsäure keine gegen diese gerichtete Immunreaktion festgestellt wird. 45

Bei der Anwendung der erfindungsgemäßen Liposomen, des erfindungsgemäßen Mittels oder der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung zur Gentherapie von Hautzellen, und speziell von Keratinozyten, einschließlich derjenigen der Haarfollikel, sowie von Langerhans-Zellen, ist dabei grundsätzlich möglich, durch die eingeschleusten Nukleinsäuresequenzen einen Defekt der transfizierten Zelle komplementierende Wirkung zu erzielen, oder aber die unerwünschte Expression einer in der Zelle vorhandenen genetischen Information mittels der durch die Liposomen eingeführten Nukleinsäuresequenz zu unterdrücken. 50

Die letztgenannte Möglichkeit gilt auch für den Fall, daß die erfindungsgemäßen Liposomen bzw. das erfindungsgemäße Mittel bei der Behandlung systemischer Erkrankungen verwendet wird. Dabei kommt es infolge der Liposomenvermittelten Transfektion der Hautzellen zur Produktion des durch die in die Zelle eingeschleusten Nukleinsäuresequenz kodierten Genproduktes, das dann seinerseits seine biologische Wirkung entfalten kann. Dabei ist es möglich, daß das entsprechende Genprodukt aus der gefäßlosen Epidermis an den Blutkreislauf abgegeben und somit systemisch zur Verfügung steht. Gegenüber der Verabreichung entsprechender Proteine oder Peptide erlaubt die Gentherapie von Hautzellen, daß die entsprechende Information transient, typischerweise über einen Bereich von 2 bis 7 Tagen, kontinuierlich in hoher lokaler Gewebekonzentration exprimiert wird und gewährleistet somit gegenüber der Verabreichung des Peptids bzw. Proteins als solchem einen länger anhaltenden konstanten Titer, da das Protein als solches nur eine geringe biologische Halbwertszeit aufweist. 55 60

Neben der Behandlung echter systemischer Erkrankungen wie beispielsweise Hämophilie A und Hämophilie B sind auch Kollagendegenerationen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen oder des erfindungsgemäßen Mittels, ggf. kosmetisch, behandelbar. 65

Unter Kollagendegenerationen sollen hierin auch Lichtdermatosen verstanden werden, bei denen es unter UV-Exposition zur Degeneration von Kollagen (und Elastin) und somit zur Faltenbildung kommt. Hier ermöglicht die hierin of-

fenbarte Gentherapie von Hautzellen bzw. die erfindungsgemäßen Liposomen oder das erfindungsgemäße Mittel vorteilhafte Wirkungen, da infolge des transienten Charakters der Gentherapie die Keratinozyten eine Reversibilität der vorgenommenen Maßnahmen gegeben ist. Die sich daraus ergebenden Vorteile, insbesondere in der Kosmetik, sind offensichtlich. So ist beispielsweise an eine erneute Kollagen- und Elastinproduktion durch die gentherapierten Hautzellen denkbar, mit der Folge, daß diese für die Haut, insbesondere deren Aussehen, so wichtigen Strukturstoffe endogen gebildet werden können.

Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen zur Behandlung von Warzen liegt das Prinzip wiederum in der gentherapeutischen Behandlung der die Warze ausbildenden Hautzellen, welche typischerweise mit viraler DNA infiziert sind. Entsprechend können durch die Liposomen die vorgenannten Zellen transfiziert werden und auf molekularer Ebene das zur Warzenbildung führende Geschehen letztendlich unterdrückt werden. Besonders bewährt hat sich hierbei die Interferon- α -Plasmid-Expression in Warzen, die durch hohe intraläsionale Spiegel an Interferon- α -Protein zum kompletten Rückgang der Papillom führt.

Der Behandlung von Alopezie unter Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen liegt ebenfalls das Prinzip zugrunde, daß letztendlich durch gentherapeutische Veränderung des Geno- und Phänotyps der Haarfollikelzellen bzw. der entsprechenden Keratinozyten das Krankheitsbild abgestellt, zumindest aber vermindert werden kann. Entsprechende Expression von Antagonisten der Androgen-Rezeptoren sowie von im Haarwachstumszyklus relevanten Cytokinen (z. B.: TGF, Transforming Growth Factor; EGF – Epidermal Growth Factor) stellen wesentliche Ansatzpunkte einer solchen Technologie dar.

Von ganz besonderer Bedeutung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen bei der Immunisierung eines Wirtsorganismus, wobei hierin unter Wirtsorganismus insbesondere Säugetiere, darunter Nutz- und Haustiere sowie Zootiere, wie Rind, Schwein, Pferde, Hunde, Katzen, Ratten, Mäuse, Affen und Geflügel verstanden werden sollen. Letztendlich können die erfindungsgemäßen Liposomen in all jenen animalischen Systemen zur Anwendung gelangen, in denen Langerhans-Zellen vorhanden sind, insbesondere jene in der Haut vorhandenen, die in der Lage sind, Antigen zu präsentieren. So kann, beispielsweise bei topischer Auftragung einer die erfindungsgemäßen Liposomen enthaltenden topischen Applikationsform, wie beispielsweise einer Creme, eine Transfektion der Langerhans-Zellen mit in der intraliposomalen Phase enthaltenen Nukleinsäure erfolgen, mit der Wirkung, daß das durch die besagte Nukleinsäure kodierte Antigen in den Langerhans-Zellen exprimiert sowie von diesen zur Stimulierung der Immunantwort an der Zelloberfläche präsentiert wird.

Somit besteht eine wirksame Möglichkeit, einen Wirtsorganismus gegen ein jegliches Antigen zu immunisieren, das durch eine Nukleinsäure direkt oder indirekt kodiert und durch Langerhans-Zellen an der Zelloberfläche präsentiert werden kann.

Ein solches Antigen, gegen das im Wirtsorganismus eine Immunantwort erzeugt werden soll, wird hierin als interessantes Antigen bezeichnet.

Eine derartige Immunisierung ist dabei nicht nur auf die Präsentation von Antigen durch die Langerhans-Zellen beschränkt, was einer aktiven Immunisierung gleichkommt, sondern ermöglicht auch eine passive Immunisierung der Gestalt, daß entsprechende Antikörper bzw. Fragmente davon, die für ein interessierendes Antigen spezifisch sind, durch mit den erfindungsgemäßen Liposomen, die eine für den Antikörper bzw. ein Fragment davon kodierende Nukleinsäure enthalten, transfizierte Hautzellen exprimiert und an den Blutkreislauf gegeben werden können, ähnlich wie bei der oben beschriebenen Therapie systemischer Erkrankungen.

Unter Antikörper sollen hierin auch Antikörperderivate verstanden werden, so z. B. auch solche nur aus einer Kette bestehende, trunkierte oder aufgrund der Spezifität des interessierenden Antigens speziell hinsichtlich ihrer Bindungsstelle konstruierte entsprechende Moleküle. Derartige Antikörper sowie deren Derivate und andere sind dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt.

Die vorgenannte Immunisierung, insbesondere wenn diese durch Verwendung einer topischen Applikationsform bedingt wird, weist ganz besondere Vorteile der Gestalt auf, daß sie ausgesprochen leicht durchführbar ist in dem Sinne, daß kein qualifiziertes Personal benötigt wird und insbesondere hygienisch in bestimmten Lagen bedenkliche Injektionen vermieden werden. Darüber hinaus ergeben sich Vorteile hinsichtlich der Haltbarkeit eines die erfindungsgemäße Liposomen umfassenden Impfstoffes, welcher durch die erfindungsgemäßen Liposomen, die pharmazeutische Zusammensetzung oder die erfindungsgemäßen Mittel dargestellt wird. Diese erhöhte Haltbarkeit wird im wesentlichen dadurch bedingt, daß nicht irgendwelches proteinhaltiges Material, sei es nun das Antigen bei der aktiven Immunisierung oder der Antikörper oder das Antikörperfragment bei der passiven Immunisierung, noch dazu in für die Injektion geeigneter Weise, vorliegen muß.

Aus der Tatsache, daß der Impfstoff im engeren Sinne erst durch die Langerhans-Zellen gebildet und letztendlich präsentiert wird, bedingt auch einen erheblichen Kostenvorteil, da auf eine Produktion von proteinhaltigem Material mit anschließender Aufreinigung verzichtet werden kann.

Aus dem im folgenden angeführten Beispiel betreffend die Herstellung der erfindungsgemäßen Liposomen werden weitere Vorteile und Merkmale der Erfindung offenbart, wobei

Fig. 1 eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gefrierbruchs (FFEM) von menschlichen Stratum corneum-Lipid-Liposomen bei Präparation durch Detergenzdialyse zeigt,

Fig. 2 eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gefrierbruchs (FFEM) von menschlichen Stratum corneum-Lipid-Liposomen, hergestellt durch Ultraschallbehandlung, zeigt,

Fig. 3 eine Nicomp Größenverteilungsanalyse von Stratum corneum-Lipid-Liposomen, hergestellt durch Ultraschallbehandlung, mit inverser Laplace-Transformation (bimodale Verteilung) zeigt,

Fig. 4 eine Nicomp Größenverteilungsanalyse von Stratum corneum-Lipid-Liposomen, hergestellt durch Detergenzdialyse, mit inverser Laplace-Transformation (bimodale Verteilung) zeigt

Fig. 5 die Zeta-Potentialverteilung der durch Ultraschallbehandlung hergestellten Stratum corneum-Lipid-Liposomen darstellt und

Fig. 6 das Ergebnis der Transfektion humaner Haut mittels Plasmid-DNA enthaltenden erfindungsgemäßen Liposo-

men zeigt.

Beispiel 1

Herstellen der erfindungsgemäßen Liposomen

5

Gewinnung des stratum corneum-Lipids

Aus kleinen, bei chirurgischen Eingriffen anfallenden Hautstücken wurde die Hornschicht enzymatisch mittels Trypsinierung gewonnen und das Gesamtlipid nach einer modifizierten Bligh & Dyer-Methode extrahiert [Lasch, J.; J. Liposome Res. 4 (1), 93–106 (1994)]. Alternativ wurde abgeschabte plantare Hornhaut verwendet.

Die Proben wurden im Dunkeln mit Chloroform/Methanol (1 : 1) bei kräftigem Schütteln in einer Stickstoffatmosphäre extrahiert. Ein Drittel des Volumens wurde als PBS-Puffer zugesetzt, um Cholesterolsulfat in die organische Phase durch NaCl "auszusalzen". Die Mischung wurde gevortext und die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die untere organische Phase wurde gesammelt und unter N₂ getrocknet.

Die Lipidzusammensetzung des plantaren Stratum corneum wurde durch Messung der Flächen unter den Reflexionsabsorptionskurven nach Trennung durch HPTLC [(Automated Multiple Development HPTLC von CAMAG; Muttentz, Schweiz); Zellmer, S.; Journal of Chromatography B, 691 (1997), 321–329] und Kalibrierung mit dem jeweiligen Lipid an mehr als 100 Probanden quantifiziert. Die Anfärbung erfolgt mittels CuSO₄/H₃PO₄ in 5%igem Methanol.

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die verschiedenen Lipidklassen entsprechend ihrem prozentualen Anteil (Mittelwerte) angegeben:

Tabelle 1

Mittelwerte der verschiedenen das Stratum corneum-Lipid ausbildenden Lipidklasse, angegeben in Gewichtsprozenten

Lipidklasse	Mittelwert Lipid (Gewichtsprozent)
Phospholipide	< 2
Cholesterolsulfat	2,06 +/- 0,13
Freie Fettsäuren	20,16 +/- 1,12
Ceramide	20,25 +/- 0,67
Sterole	43,53 +/- 3,04
Triacylglycerole (Neutralfette)	4,56 +/- 0,54
Sterolester	9,44 +/- 0,67

Herstellung von menschlichen Stratum corneum-Lipid-Liposomen (hSCLs)

hSCLs wurden zum einen durch Ultraschall hergestellt, indem eine Lipiddispersion in PBS, pH 7,4, im Branson Sonifier bis zur Transparenz beschallt wurde, wobei die Beschallung in Intervallen von 0,5 min unter Eiswasserkühlung erfolgte.

Alternativ wurden mit der sogenannten Detergenzverdünnungsmethode hSCLs hergestellt. Speziell wurden Cholat-Lipid-Mischmizellen in einem speziellen Rotationsdialysator (Diachem AG, Lagnau/Zürich) in Lipidvesikel überführt.

Die Ergebnisse beider Verfahren sind in den Fig. 1 und 2 dargestellt, wobei Fig. 1 eine elektronenmikroskopische Aufnahme (FFEM) eines Gefrierbruches von hSCLs zeigt, die durch Detergenzdialyse hergestellt wurden, und in Fig. 2 eine elektronenmikroskopische Aufnahme (FFEM) eines Gefrierbruches von hSCLs zeigt, die durch Ultraschallung

hergestellt wurden.

In beiden Fällen repräsentiert der dargestellte Balken 100 nm und die eingekreisten Pfeile die Bedampfungsrichtung.

Die hSCLs wurden weitergehend hinsichtlich ihrer Größenverteilung durch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) mit einem Nicomp Submicron Particle Sizer, Model 370, charakterisiert. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Fig. 3 und 4 dargestellt, wobei Fig. 3 die Ergebnisse der durch Beschallung hergestellten Liposomen und Fig. 4 die durch Detergenzdialyse hergestellte Liposomen zeigt.

Aus Fig. 3 ist ersichtlich, daß 74,62% der Liposomen einen Durchmesser von 160,6 nm aufweisen, wobei eine zweite, bedeutend kleinere Fraktion, die 25,38% der Liposomen ausmacht, einen Durchmesser von 416,7 nm aufweist.

Bei der Herstellung der Liposomen mittels Detergenzdialyse sind, wie aus Fig. 4 ersichtlich, ebenfalls zwei Populationen von Liposomen hervorgegangen, wobei 87,3% der Liposomen einen Durchmesser von 183,5 nm aufweisen, gegenüber einer zweiten, wenngleich mit 12,7% deutlich geringeren Population, die einen Durchmesser von 979,7 nm aufweist.

In beiden Fällen wurden die vorgenannten Daten aus den Primärdaten unter den folgenden Bedingungen erhalten: Glättungsfaktor 3, minimaler Durchmesser 80 nm, plot size 39, gesammelte Impulse, 8000 K in 30 Min., Zählrate 300 Hz.

In Fig. 5 ist die Bestimmung des Zeta-Potentials der hSCLs dargestellt, die mit der Zeta Master Version PCS: v1.2 (Malvern Instruments, England) im Zelltyp ZEMO10 Cross Beam Mode bestimmt wurde (Lasch, J.; J. Liposome Res. 5(1), 99-108 (1995)).

Wie aus Fig. 5 ersichtlich, beträgt das Zeta-Potential der hSCLs -64 bis -66 mV. Dieser relativ hohe negative Wert kann auf den Gehalt an Cholesterolsulfat zurückgeführt werden.

Die einzelnen, verschiedenen Zetapotentialen entsprechenden Intensitäten sind nochmals in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Zetapotentialverteilung (mV) von durch Beschallung hergestellten hSCLs

Zeta	Inten- sität	Zeta	Inten- sität	Zeta	Inten- sität
-150,0	0,0	-83,3	0,0	-16,7	0,0
-141,7	0,0	-75,0	24,2	-8,3	0,0
-133,3	0,0	-66,7	44,8	0,0	0,0
-125,0	0,0	-58,3	31,0	8,3	0,0
-116,7	0,0	-50,0	0,0	16,7	0,0
-108,3	0,0	-41,7	0,0	25,0	0,0
-100,0	0,0	-33,3	0,0	33,3	0,0
-91,7	0,0	-25,0	0,0	41,7	0,0

Andere Verfahren zur Kennzeichnung der die Liposomenhülle ausbildenden Lipidschicht, wie beispielsweise die Messung der Phasenübergangstemperatur (T_m) ergab keine Ergebnisse, was durch den hohen Gehalt an Cholesterol im Stratum corneum-Lipid bedingt wird.

Beispiel 2

Transfektion humaner Haut mittels der erfindungsgemäßen Plasmid-DNA-enthaltenden Liposomen

50 µg Plasmid-DNA wurden mit einem entsprechenden Anteil an lyophilisiertem Lipidgemisch versetzt, wobei das

Lipidgemisch in der unter Beispiel 1 erläuterten Weise hergestellt wurde. Unter intensivem Schütteln wurden Plasmid-DNA enthaltende humane Stratum corneum-Liposomen gebildet.

Nach entsprechender Vorbehandlung (Menk) bzw. Hydrierung des Stratum corneums mit Urea MENK (50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 mM K₃PO₄) erfolgte die Applikation des oben genannten Plasmid-DNA-haltigen Liposomengemisches. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die entsprechenden Hautproben in ihre epidermalen und dermalen Anteile getrennt. Der epidermale Anteil wurde in einem quantitativen Test auf β -Galactosidase-Proteinaktivität untersucht. Nach Lyse der Epidermis in Lysepuffer mit mechanischer Zerkleinerung wurden 2 ml des Zellextraktes mit Reaktionspuffer (0,035 mmol Galacton) Chemilumineszenz-Substrakt (Tropix Bedford, Massachusetts) gemischt. Nach der Inkubation für eine Stunde wurde Emerald Lumineszenzverstärker (Tropix Bedford, Massachusetts) hinzugegeben und die Chemilumineszenz in einem Chemiluminometer (z. B. Monolight 1005, Analytical Lumineszenz, San Diego, Californien) gemessen. Die β -Galactosidase-spezifische Aktivität in den epidermalen Extrakten wurde als Verhältnis der Lichteinheiten geteilt durch den Proteingehalt ermittelt. Die Negativkontrolle wurde durch nicht- β -Galactosidaseexprimierende Plasmide (z. B. Vektorkontroll-DNA) unter identischen Bedingungen erhalten. Jegliche Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in Fig. 6 für jede der Behandlungsgruppen dargestellt. Die absoluten Mengen an β -Galactosidase-Enzym kann ermittelt werden, indem die erhaltenen Werte der Lichteinheiten mit einer Eichkurve verglichen werden, die durch Hinzufügen bekannter Mengen an gereinigtem β -Galactosidaseenzym zu β -Galactosidase-negativen epidermalen Zellextrakten konstruiert wurde. Zusammenfassend zeigt sich, wie in Fig. 6 dargestellt, in Abhängigkeit entsprechend der Vorbehandlung eine hochsignifikante Steigerung der in der Epidermis hergestellten Menge an β -Galactosidase-Markerprotein.

Eine Steigerung der Transfektionseffizienz bzw. der Menge an erhaltenen Genprodukten ist im Rahmen der üblichen Fähigkeiten eines Fachmanns auf diesem Gebiet beispielsweise durch weitergehende Optimierung bzw. Vorbehandlung mit anderen Penetrationsverstärkern bzw. Zurverfügungstellung von geeigneten Nukleinsäurekonstrukten möglich.

Die in der vorstehenden Beschreibung sowie in den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Patentansprüche

1. Liposom umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, **dadurch gekennzeichnet**, daß die chemische Zusammensetzung der Lipidphase der einer Hautschicht entspricht und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt.

2. Liposom nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautschicht humane Epidermis ist.

3. Liposom nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautschicht das Stratum corneum ist.

4. Liposom umfassend eine eine Liposomenhülle ausbildende Lipidphase und eine von der Lipidphase umschlossene intraliposomale Phase, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Liposom betreffend die Lipidklassen folgende Komponenten erfaßt:

Phospholipide:	< 2 Gew.-%
Cholesterolsulfat:	2 Gew.-%
Freie Fettsäuren:	20 Gew.-%
Ceramide:	20 Gew.-%
Sterole:	43 Gew.-%
Triacylglycerole (Neutralfette):	4 Gew.-%
Sterolester:	9 Gew.-%

und die intraliposomale Phase mindestens eine Verbindung enthält, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und niedermolekulare Verbindungen sowie aus diesen zusammengesetzte Moleküle oder Strukturen umfaßt.

5. Verfahren zur Herstellung von Liposomen, **dadurch gekennzeichnet**, daß

a) Stratum corneum-Lipid gewonnen wird und

b) aus dem Stratum corneum-Lipid unter Ultraschallbehandlung und/oder Detergenzdialyse Liposomen hergestellt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Stratum corneum-Lipid gewonnen wird, indem Stratum corneum enzymatisch und/oder mechanisch von der Haut abgetragen wird und anschließend in Methanol-Chloroform extrahiert wird.

7. Liposom, herstellbar gemäß einem Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche.

8. Liposom nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die intraliposomale Phase eine wäßrige Phase ist.

9. Liposom nach einem der Ansprüche 1–8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Wachstumsfaktoren, Antibiotika, schmerzlindernde Agenzien, Agenzien, die die Zellteilung und/oder die Vaskularisierung beeinflussen, koagulierende und anti-koagulierende Agenzien, Cytokine, chemisches Attraktants, Enzyme, und Kombinationen davon umfaßt.

10. Liposom nach einem der Ansprüche 1–9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Verbindung eine Nukleinsäuresequenz ist.

11. Verfahren zur Transfektion von Zellen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zu transfizierenden Zellen mit einem Liposom gemäß einem der vorangehenden Ansprüche in Kontakt gebracht werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die zu transfizierenden Zellen Hautzellen sind.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11–13, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Keratinozyten der Haarfollikel sind.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11–13, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen epidermale Langerhans-Zellen sind.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche sowie einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
17. Mittel zur topischen Verabreichung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche.
18. Mittel nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, die Cremes, Salben, Gele, Sprühverbände und Tinkturen umfaßt.
19. Mittel nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin einen Gehalt an mindestens einer Verbindung aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Permeabilitätsverstärker und Quellmittel umfaßt.
20. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Genterapie von Hautzellen.
21. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen in situ vorliegen.
22. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen ex vivo vorliegen.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 20–22, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Hautzellen des Stratum corneum, Stratum granulosum und Stratum spinosum sowie Keratinozyten umfaßt.
24. Verwendung nach einem der Ansprüche 20–23, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen Keratinozyten der Haarfollikel sind.
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 20–24, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautzellen epidermale Langerhans-Zellen sind.
26. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen der Haut.
27. Verwendung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die genetische Hauterkrankungen, Psoriasis, Hauttumoren und Wunden umfaßt.
28. Verwendung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Hauterkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Epidermolysis bullosa simplex, Epidermolysis hyperkeratosis, palmoplantare Keratose, junctionale Epidermolysis bullosa, dystrophe Epidermolysis bullosa, lamellare Ichthyose und Xeroderma pigmentosum umfaßt.
29. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Behandlung von Warzen.
30. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Behandlung systemischer Erkrankungen.
31. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die systemische Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Hämophilie A und Hämophilie B sowie Kollagendegenerationen umfaßt.
32. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Behandlung von Alopezie.
33. Verwendung der Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche, der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Mittels nach einen der vorangehenden Ansprüche zur Immunisierung eines Wirtsorganismus.
34. Verwendung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus ein menschlicher Organismus ist.
35. Impfstoff, dadurch gekennzeichnet, daß der Impfstoff einen Gehalt an Liposomen nach einem der vorangehenden Ansprüche aufweist, wobei die Liposomen Nukleinsäure, die die genetische Information für ein interessierendes Antigen umfaßt, oder Nukleinsäure umfassen, die die genetische Information für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment umfaßt, wobei der Antikörper bzw. das Antikörperfragment spezifisch für das interessierende Antigen ist.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

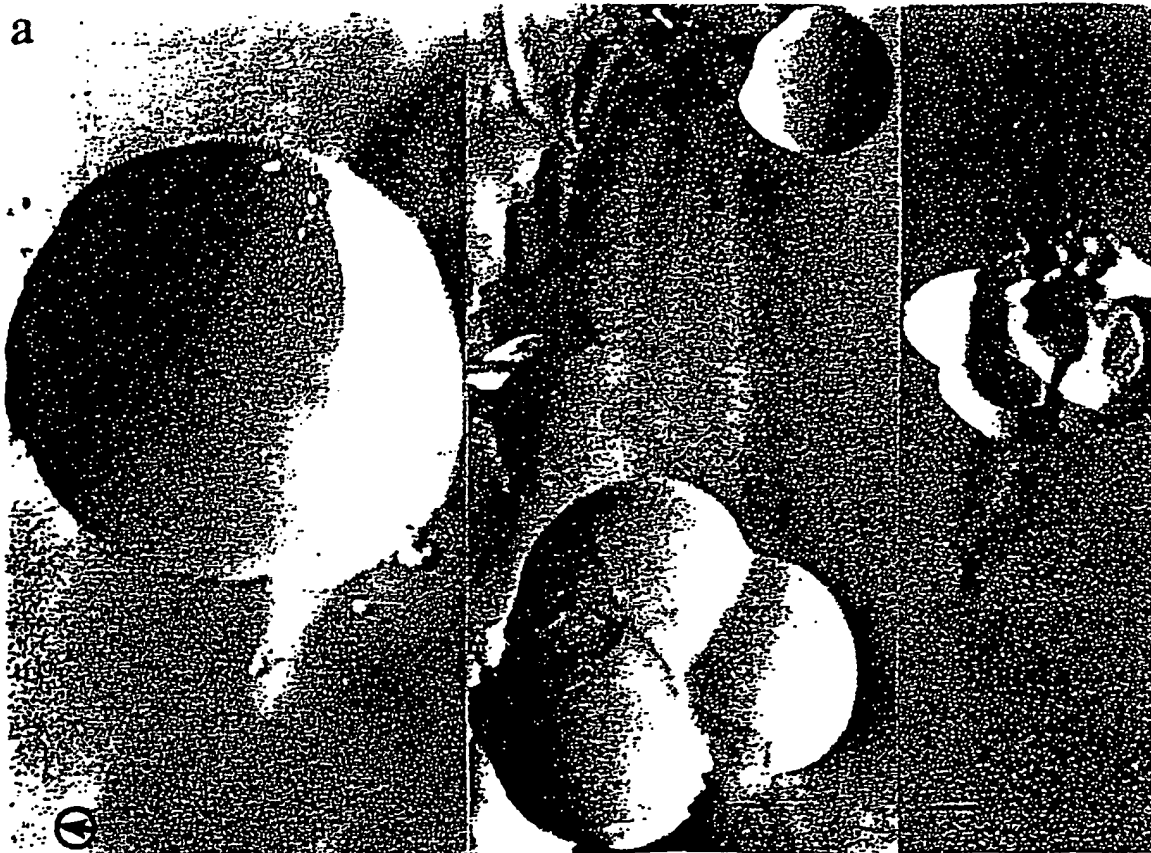


Fig. 2

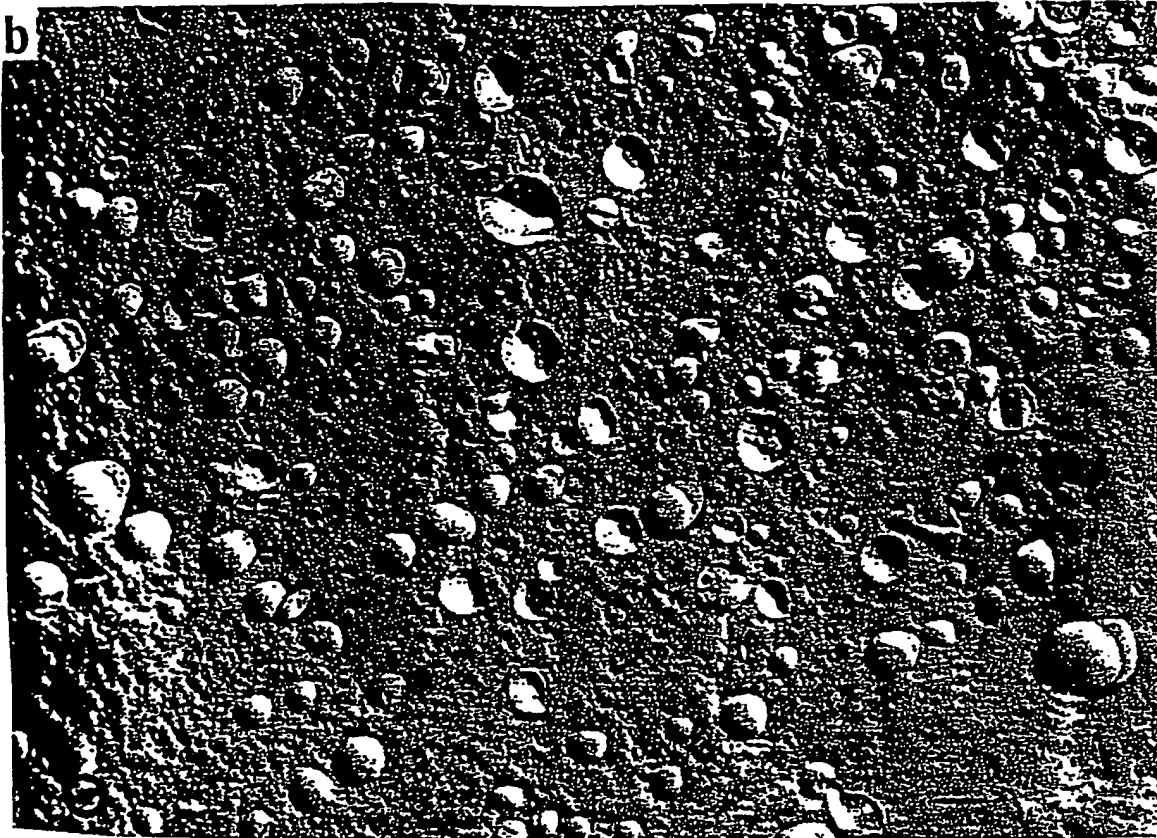


Fig. 3

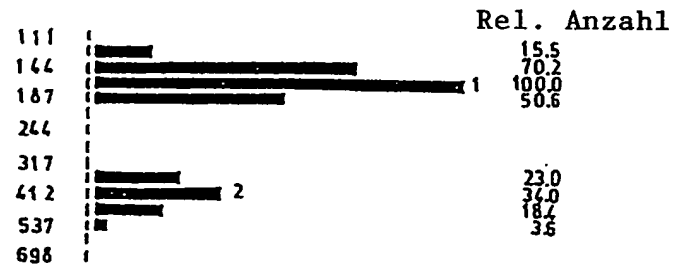
 Größe in Nanometer
 (logarithmische Skalierung)


Fig. 4

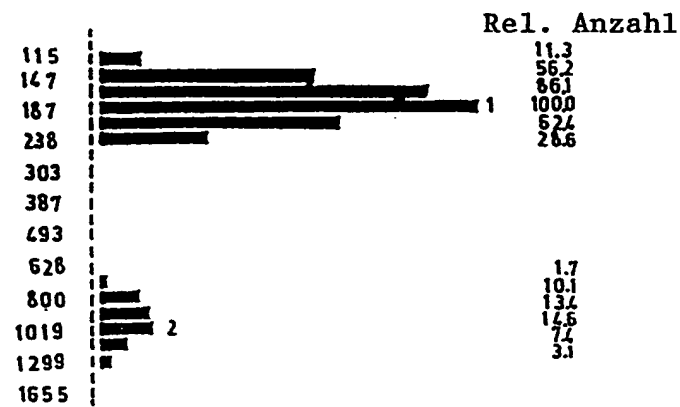
 Größe in Nanometer
 (logarithmische Skalierung)


Fig. 5

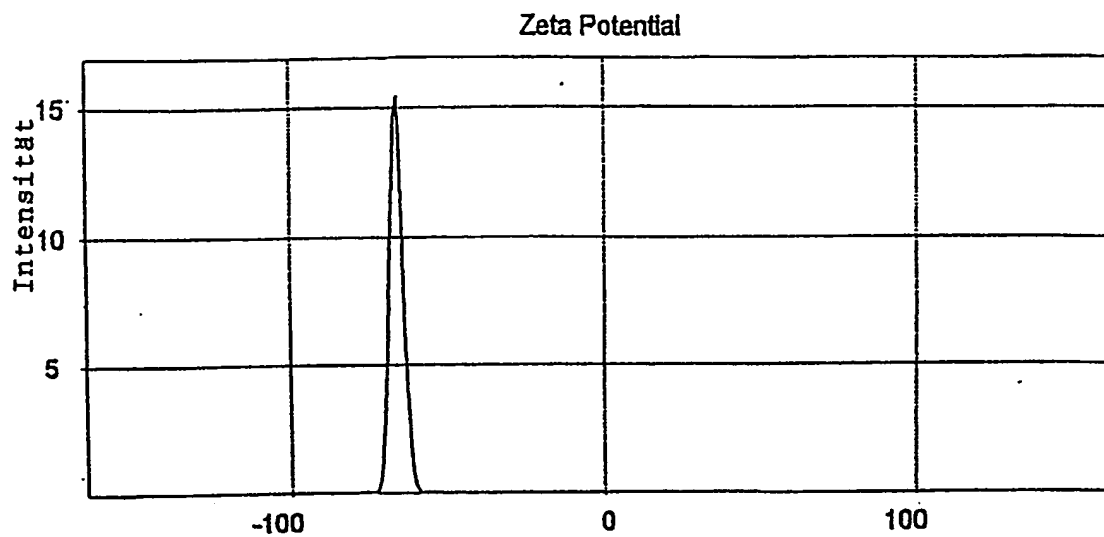
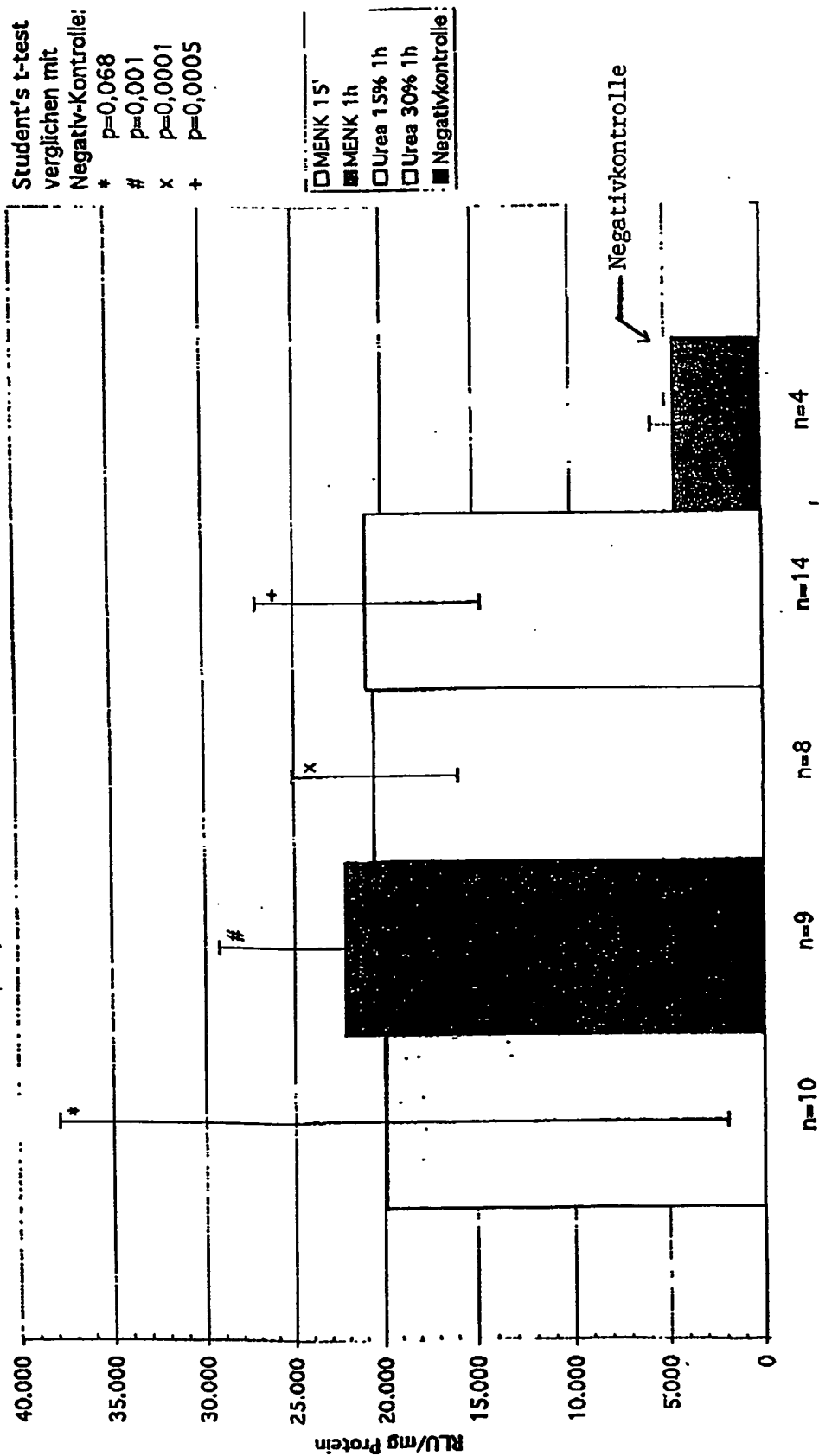


Fig. 6

Transfektion von Menschenhaut mit einer
liposomalen Plasmid-Lösung:
pCMV-βGal/hSCLs (50μg/156μg)



LIPOSOMES AND A METHOD OF CELL TRANSFECTION

[Liposomen und Verfahren zur Transfektion von Zellen]

Hengge, Ulrich

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Washington, D.C.

Month Year

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

<u>Country</u>	:	Germany
<u>Document No.</u>	:	DE 197 40 092 A1
<u>Document Type</u>	:	Laid-Open Patent Application
<u>Language</u>	:	German
<u>Inventor</u>	:	Hengge, Ulrich
<u>Applicant</u>	:	Hengge, Ulrich
<u>IPC</u>	:	A 61 K 9/127
<u>Application Date</u>	:	09.12.97
<u>Publication Date</u>	:	03.18.99
<u>Foreign Language Title</u>	:	Liposomen und Verfahren zur Transfektion von Zellen
<u>English Title</u>	:	Liposomes and a Method of Cell Transfection/1¹

¹ Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

1

The invention relates to liposomes comprising a lipid phase forming a liposome membrane and an intraliposomal phase enveloped by the lipid phase, the lipid phase has a chemical composition corresponding to a skin layer and the intraliposomal phase contains at least one compound selected from the group consisting of nucleic acids, proteins, carbohydrates, lipids, and low-molecular compounds as well as molecules or structures composed thereof, and to a method of preparation of such liposomes. The invention also relates to a method of cell transfection, wherein the cells being transfected are brought in contact with the liposomes according to the invention. The invention further relates to a pharmaceutical composition and to an medical form for topical administration, which contain the liposomes according to the invention, as well as to a method of application of the liposomes, the pharmaceutical composition and medical form according to the invention.

2

Description

The present invention relates to liposomes having a lipid phase forming the liposome membrane and an intraliposomal phase enveloped by the lipid phase, a method of their preparation, as well as to liposomes prepared therefrom, a method of cell transfection, an medical form for topical administration, as well as application of the liposomes and medical form.

With the expansion of understanding of biological relationships on the molecular level, molecular medicine has recently, which has a major effect on new therapeutic concepts and medications. This also applies to the skin, whose function goes far beyond the obvious barrier function and whose diseases are in the majority of cases are much less obvious.

A potential treatment of skin diseases involves insertion and expression of genes in the epidermis, i.e., the gene therapy of the cells forming the epidermis. Keratinocytes are very important in this case.

Various methods are known in the art for conducting *in-situ* keratinocyte transfection. One of the options is the intradermal injection, which causes the local transfection, i.e., expression of the applied genetic material to a very narrowly limited dermal area. The expression typically occurs for 2 to 7 days, and it does not result in any integration of the applied genetic material in the genome of the keratinocytes. The main disadvantage of this technique consists of the fact that the corresponding transfection is limited to the immediate injection area, and the method is invasive, which can be carried out only by skilled personnel under appropriate hygienic conditions.

In the same manner, the use of microprojectiles in the form of microscopic gold particles coated with DNA, which are brought directly into the cells by means of a so-called gene gun is limited to the local application of gene material. This method also has a number of disadvantages, which include the use of relatively expensive gold particles as well as the required coating operation; in addition, the gene gun should be used, which requires rather complicated equipment and also skilled personnel, without yielding the desirable results.

Finally, topical methods are also known in the art, wherein a complexed DNA should be brought directly into the cells that form the epidermis. Thus cationic lipids, which are stored on an anionic DNA, and receptor-mediated endocytosis are used. The former technique did not bring any results in practical applications. The latter technique, e.g., in the form of Transfer infection is immunogenic based on the immunogenic component (a dissociation protein of adenovirus or hemagglutinated virus is used in Japan, and for this reason it can be can be successfully applied only once.

Further liposomes have been described in the field of cosmetology, which contain a plasmid DNA in an inner aqueous phase. This technique provides for successful transfection only in a small percentage of cells.

The present invention is based on the problem of providing liposomes which ensure a high skin cell, more specifically, keratinocyte, transfection rate.

Another object of the invention is to provide a method of preparation of such liposomes.

Finally, the invention is based on the problem of providing a method of cell transfection, more specifically, keratinocyte transfection which ensures a high transfection rate.

The invention is also based on the problem of providing a pharmaceutical composition which ensures improved application of substances, more specifically, topical application compared to the state of the art.

The invention is further based on the problem of providing a medical form for topical administration of chemical compounds.

The medical form according to the invention should be indicated for gene therapy of skin cells, for the prophylaxis and/or treatment of skin diseases including warts, systemic diseases and alopecia, and also as an immunizing medical form.

According to the invention, the problems are solved by providing liposomes having a lipid phase that forms the liposome membrane

and an intrapolisomal phase that is enclosed in the lipid phase, wherein the chemical composition of the lipid phase corresponds to the skin layer and the intraliposomal phase contains at least one compound that is selected from the group consisting of nucleic acids, proteins, carbohydrates, lipids, and low-molecular compounds, as well as molecules or structures of their compositions.

The problems are also solved by providing liposomes having a lipid phase that forms the liposome membrane and an intraliposomal phase enclosed in the lipid phase, wherein the liposomes of a given lipid class contain the following components:

Phospholipid	< 2 % by weight
Cholesterol sulfate	2 by weight
Free fatty acids	20 by weight
Ceramide	20 by weight
Sterol	43 by weight
Triacylglycerol (neutral fat)	4 by weight
Sterol ester	9 by weight

and the intraliposomal phase contains at least one compound that is selected from the group consisting of nucleic acids,

3

proteins, carbohydrates, lipids, and low-molecular compounds, as well as molecules or structures formed therefrom.

The problems are also solved according to the invention by providing a method comprising: a) obtaining stratum corneum lipid and b) preparing liposomes from the stratum corneum lipid by ultrasonic treatment and/or by detergent dialysis.

The problems are further solved by means of the liposomes that are prepared by the method according to the invention.

Further, the problems are solved according to the invention by providing a method of cell transfection, wherein the cells being transfected are brought in contact with the liposomes according to the invention.

According to the invention, the problems are also solved by providing a pharmaceutical composition that contains the liposomes according to the invention and a pharmaceutically acceptable vehicle.

The problems are also solved according to the invention by providing an medical form for topical application of chemical compounds, wherein the medical form contains the liposomes according to the invention.

The problems are further solved according to the invention by the use of the liposomes according to the invention,

pharmaceutical composition according to the invention, or medical form according to the invention for skin cell genetic therapy.

The problems are also solved by the use of the liposomes according to the invention, pharmaceutical composition according to the invention or the medical form according to the invention for the prophylaxis and/or treatment of skin diseases including warts, systemic diseases, and alopecia, as well as the use of the liposomes according to the invention, pharmaceutical composition according to the invention or the medical form according to the invention for immunizing the host organism.

The problems are also solved by means of a vaccine that contains the liposomes according to the invention, wherein the liposomes contains a nucleic acid having the genetic information for the antigen of interest, or contains a nucleic acid having the genetic information for an antibody or for an antibody fragment, which antibody or antibody fragment is specific for the antigen of interest.

With the lipid phased building the liposome membrane and the intraliposomal phase that is enclosed in the lipid phase, in which the liposomes have the chemical composition of the lipid phase corresponding to that of the skin layer, the skin layer can be human epidermis.

In another embodiment, the skin layer can be the stratum corneum.

In the method of preparation of liposomes according to the invention, the stratum corneum lipid can be obtained in which the stratum corneum is recovered enzymatically and/or mechanically from the skin and is then extracted in methanol/chloroform.

In an embodiment of the liposomes according to the invention, the intraliposomal phase can be an aqueous phase.

Further, the intraliposomal phase can contain at least one chemical compound that is selected from the group consisting of nucleic acids, proteins, carbohydrates, lipids and low-molecular compounds, as well as molecules or structures composed thereof.

In addition, the compound can be selected from the group containing growth factors, antibiotics, pain killers that influence cell division and/or vascularization, coagulants and anti-coagulants, cytokines, chemical attractants, enzymes, and their combinations.

In an especially preferred embodiment, the chemical compound is a nucleic acid sequence.

In an embodiment of the cell transfection method according to the invention, the cells being transfected are skin cells.

In a preferred embodiment, the skin cells are selected from the group consisting of stratum corneum, stratum granulosum, and stratum spinosum, as well as keratinocytes.

In an especially preferred embodiment, the cells in the transfection method according to the invention are keratocytes of the hair follicles.

In another especially preferred embodiment of the transfection method according to the invention, the cells are epidermal Langerhans cells.

In the medical form for topical administration of chemical compounds according to the invention, the medical form is selected from the group consisting of creams, ointments, gels, spray patches, and tinctures.

In another preferred embodiment of the medical form according to the invention, the medical form can contain at least one compound selected from the group consisting of a permeability enhancer and a swelling agent.

In application of the liposomes disclosed herein, pharmaceutical compositions or medical forms for gene therapy of skin cells can be *in situ*.

In an alternative embodiment of the application according to the invention, the skin cells can be *ex vivo*.

Furthermore, in the application mentioned above, the skin cells can be selected from the consisting of stratum corneum, stratum granulosum, and stratum spinosum, as well as keratinocytes.

In another embodiment, the skin cells are keratinocytes of the hair follicles.

In a further embodiment of the application according to the invention, the skin cells are epidermal Langerhans cells.

In the application according to the invention of the liposomes that are disclosed herein, the pharmaceutical compositions that are disclosed herein or the medical forms disclosed herein for the prophylaxis and/or treatment of skin diseases, it is provided that in a preferred embodiment the disease is selected from the group consisting of genetic diseases, psoriasis, skin tumors, and injuries.

In an especially preferred embodiment, the genetic skin disease is selected from the group consisting of epidermolysis bullosa simplex, epidermolysis hyperkeratosis, palmoplantar keratosis,

junctional epidermolysis bullosa, dystrophic epidermolysis bullosa, lamellar ichthyosis und xeroderma pigmentosum.

4

In the application according to the invention of the liposomes that are disclosed herein, the pharmaceutical compositions that are disclosed herein, or the medical forms that are disclosed herein for treatment of systemic diseases, in an especially preferred embodiment, the systemic diseases are selected from the group consisting of hemophilia A and hemophilia B, as well as collagen degeneration.

In the application according to the invention of the liposomes that are disclosed herein, the pharmaceutical compositions that are disclosed herein, or the medical forms that are disclosed herein for immunizing the host organism, in an especially preferred embodiment, the host organism is the human body.

The present invention is based on an unexpected discovery of the fact that using the liposomes according to the invention, an especially high skin cell transfection rate, more specifically for keratinocytes, can be achieved. This effect is based on a high degree of hydrophobicity of the liposome membranes, i.e., their lipid makeup. DNA that is encapsulated in the liposomes according to the invention can overcome the skin barriers and can be received and expressed in the deeper skin layers.

The penetration capacity described herein for the liposomes according to the invention ensures also the release of the compounds of substances contained in the liposomes including nucleic acids in the deeper layers of the epidermis or skin, which is an advantage from the point of view of both the delivery of pharmaceutically active compounds and the cosmetic treatment of the skin.

It is especially remarkable that the application of the liposomes according to the invention and the medical forms and the method of nucleic acid application can be repeated many times, and that no immune response occurs, more specifically against bare nucleic acids, which is an important advantage over other transfection techniques.

Because of the high transfection rates, it is for the first time possible to ensure simple and reliable transfection of many skin cells, thus to provide the ground for actually realizing gene therapy by using the inherent advantages offered by the skin.

These advantages include among other things the fact that in addition to causal therapy, the tissue showing the cells being treated can be easily removed in the event of an undesired side effect and subsequently, based on the facts, the ectopic expression that is introduced by nucleic acids of the liposomes according to the invention can be ruled out, so the therapy as such can be interrupted at any time.

In addition, keratinocytes are relatively easy to obtain and to expand by culturing, and methods and means are known in the art to provide modulation of expression of the nucleic acid sequences that are present in the keratinocytes.

The intraliposomal phase can be in the form of an aqueous phase, and it contains a special medium, formed by adding certain compound. The aqueous phase can have, e.g., a distinctive pH-value, a certain buffer, or ion concentration that stability, conformation, and biological activity in such a manner as to affect its contents, chemical compound (s), whereby, in the case where a nucleic acid construct is available in the intraliposomal phase that is used for transfection, the transfection rate of the cells that are treated with the liposomes according to the invention is influenced. The formation of an appropriate medium to achieve the above-mentioned results is known to those skilled in the art.

The chemical compounds contained in the intraliposomal phase are such compounds in which there is a chemical bond between at least two atoms, and they include also biochemical and biological compounds.

The low-molecular compounds here mean those that have a molecular weight below 10 000 and, more specifically, those that contain carbon. Such compounds include also carboxylic acids, amino acids, carbohydrate monomers, lipids including steroids, lactams, lactones, and others. The proteins here mean peptides and in general polymers having at least two peptidic amino acids that are tied together.

The nucleic acids and nucleic acid sequences here means both DNA and RNA. A nucleic acid (or nucleic acid sequence) can be either bare or complexed /associated. It is further possible that a nucleic acid (or nucleic acid sequence) be present as an individual strand, or be double-stranded or a triplet. A nucleic acid sequence can also be a ribosome or an antisense nucleic acid. Moreover, it can be naturally present as a recombinant. A nucleic acid (or nucleic acid sequence) can further contain other elements that influence both its transcription and translation as well as stability. Thus it can contain, e.g., cell-specific as well as inducible promoters, terminators, and other regulatory elements such as, for instance, enhancers. Finally, a nucleic acid (or nucleic acid sequence) can also contain elements that ensure insertion of the nucleic acid (or nucleic acid sequence) in the chromosomes of the cells being transfected or also elements that hinder insertion of the nucleic acid (or nucleic acid sequence) in the cell genome. The latter can be especially helpful when only the transient expression of the transfecting nucleic acid (nucleic acid sequence) is sought.

In principle, a nucleic acid (or a nucleic acid sequence) can be formed in such a manner that it could have the desired effect both on the RNA level and on the translation and transfection level. The measures taken here in the nucleic acid (nucleic acids sequence) and formation of a medium by means of which such nucleic acid (nucleic acids sequence) is given appropriate properties or effect such as, for instance, a special configuration such as Z-configuration are known to those skilled in the art.

The nucleic acids here means also oligonucleotides including antisense oligonucleotides for controlling transcription and/or translation of the nucleic acid sequences that are present in the cells.

Cell transfection with liposomes is known to those skilled in the art.

In the method of cell transfection according to the invention, the use of the liposomes according to the invention is advantageous because the cells selected from the group consisting of the skin cells of the stratum corneum, stratum granulosum, and stratum spinosum as well as keratinocytes and keratinocytes of the hair follicles and epidermal Langerhans cells can be transfected *in vivo*, and at the same time, the above-mentioned cells can also be transfected *ex vivo*.

It will be apparent from the above description that the

5

the inherent advantages of the liposomes according to the invention can be specifically realized when they are contained in a pharmaceutical composition.

It has been unexpectedly found that when the liposomes according to the invention are used, common pharmaceutical compositions and, more specifically, medical forms for topical administration of the chemical compounds can be prepared that allow for especially efficient release of the chemical compounds containing the intraliposomal phase in the cell and in the respective layers of the epidermis and dermis. In another aspect, it is also possible to implement a special depot administration of the chemical compounds contained in the liposomes.

A pharmaceutically acceptable vehicles include among other things water, buffer solutions, and the like. They include herein also any vehicles known to those skilled in the art that is used for the preparation of topical application forms such as creams, ointments, gels, spray patches, and tinctures.

The chemical compounds herein means the above-defined compounds including, more specifically, those nucleic acids that are described above even though not mentioned.

The medical forms herein are, finally, embodiments of the pharmaceutical compositions according to the invention.

Both the pharmaceutical compositions and medical forms for topical administration that are described herein can also contain a substance that is not present in the liposomes that are contained therein.

A medical form for topical administration can be made as a cream, ointment, gel, spray patch, or tincture. The medical form ensures delivery of the liposomes according to the invention in a matrix, which is normally applied to the skin and in accordance and enables contact between the skin and the liposomes, if required, after the exposure time. Liposome distribution in the above-mentioned matrix allows for statistical regulation of the transfection capacity for each individual cell.

The above-mentioned topical administration forms further ensure that a comparatively larger area of the skin can be treated, i.e., a larger area of skin cells can be transfected when nucleic acid sequences are present in the intraliposomal phase. Transfection, more specifically in its clinical application, can be conducted without the need in specially qualified personnel or special conditions.

The medical form according to the invention can be prepared according to its activity, handling, and stability with modification of the compounds forming the matrix using the methods and techniques known to those skilled in the art. The same applies also to the preparation of creams, ointments, gels, spray patches and tinctures.

Based on transfection rates that can be achieved with their help, both the liposomes according to the invention as well as the medical forms that contain them are especially advantageous in the gene therapy of skin cells. It can be conducted with the respective skin cells, and more specifically, human keratinocytes including those of the hair follicles as well as epidermal Langerhans cells *in situ*, i.e., as part of the patient's skin cover; it is possible, at the same time, to provide gene therapy *ex vivo*, when the skin cells or skin tissue and also human keratinocytes including those from the hair follicles as well as epidermal Langerhans cells are present in culture. It will be apparent that in the *in situ* case, the medical forms according to the invention containing nucleic acids in the intraliposomal phase have a special advantage, whereas in the case of the *ex vivo* gene therapy, the liposomes according to the invention have an obvious advantage.

More specifically, with the transient gene expression, with the nucleic acids (nucleic acid sequences) that are delivered by the

liposomes the therapy as well as facilitated control of the therapy scope by appropriately large-area topical application of the medical forms according to the invention can be exercised without problems. More specifically, in terms of the renewed treatment, it is remarkable that with respect to such biological system as, e.g., the human skin, the delivered nucleic acids cannot cause immune reaction against them.

When the liposomes according to the invention, the medical forms according to the invention, or pharmaceutical compositions according to the invention are used for gene therapy of the skin cells, more specifically keratinocytes including those of the hair follicles as well as Langerhans cells, it is possible in principle, by means of the introduced nucleic acid sequences, to ensure an effect complementary to a defect of the cells being transfected or to suppress an undesired expression of the genetic information available in the cells by means of nucleic acid sequences brought in with the liposomes.

The latter capability is also useful in the event that the liposomes according to the invention or the medical forms according to the invention are used for treatment of systemic diseases. In such case, the liposome mediated transfection of the skin cells causes emergence of gene products encoded by the nucleic acid sequences that have been brought into the cells, which [products] can in their turn develop their own biological activity. The appropriate gene products can be deposited in the non-vascular epidermis in blood circulation to be systemically available. Compared to administration of corresponding proteins or peptides, gene therapy of the skin cells ensures expression of transient information, typically for 2 to 7 days, continuously in higher local tissue concentration and also ensures, compared to delivery of peptides and proteins, a constant titer that is longer lasting, while proteins have only a small biological half life period.

In addition to treatment of purely systemic diseases such as hemophilia A and hemophilia B, collagen degeneration disorders can also be handled when cosmetically required with the use of the liposomes according to the invention of the medical forms according to the invention.

Collagen degeneration disorders herein mean also photodermatoses when degeneration of collagen (and elastin) occurs under the

6

effect of the UV exposure, associated with wrinkling. In this regard, the gene therapy of the skin cells disclosed herein as well as the liposomes according to the invention or the medical forms according to the invention allow for an advantageous effect because reversibility of the measures taken is ensured owing to the transient character of the gene therapy of the keratinocytes. The advantage of this feature, especially in cosmetics, is obvious. Thus, for instance structural substances

that are so important for the skin, more specifically, for its appearance, can be endogenically built because of the restored collagen and elastin production with the help of genetically treated skin cells.

When the liposomes according to the invention are used for treatment of warts, the concept is again based on the gene therapy treatment of the skin cells forming the wart, which are normally infected with a viral DNA. Accordingly, the above-mentioned cells can be transfected with the liposomes and the event that leads to wart formation can be completely suppressed on the molecular level. This is especially reliable with the interferon-alpha plasmid expression in warts that causes complete papilloma remission because of high intra-lesion level of the interferon-alpha protein.

Alopecia treatment with the use of the liposomes according to the invention is based on the concept according to which it is at least reduced by means of the gene therapy change in the genotype and phenotype of the hair follicle cells and corresponding keratinocytes that stop the disease pattern. This technique is substantially based on an appropriate expression of antagonists of the androgen receptors as well as cytokines relevant to the hair growth cycle (e.g., TGF, Transforming Growth Factor; EGF - Epidermal Growth Factor).

The use of the liposomes according to the invention is especially important in immunizing a host organism, with the host organisms herein being, more specifically, mammals, mainly agricultural animals and pets as well as zoo animals such as bovine animals, pigs, horses, dogs, cats, rats, mice, apes, and poultry. Finally, the liposomes according to the invention can be used in all animal systems in which the Langerhans cells are present, which are capable of providing an antigen. Thus, for instance, the topical application of topical application forms containing the liposomes according to the invention such as a cream can ensure transfection of the Langerhans cells with nucleic acids contained in the intraliposomal phase, with the result that the antigen encoded by the above-mentioned nucleic acids is expressed in the Langerhans cells and provided by them for stimulating the immune response on the cell surface.

Thus there is an opportunity of immunizing the host organism against any antigen that is directly or indirectly encoded by a nucleic acid and which is provided on the skin surface by means of the Langerhans cells.

Such antigen that is generated against the immune response in the host organism will be referred to herein as an antigen of interest.

Immunization is not limited to the provision of an antigen by means of the Langerhans cells, which is equivalent to the

active immunization, but is also enables passive immunization of the kind in which an appropriate antibodies or their fragments, which are specific for the antigen of interest, are expressed in the transfected skin cells through the liposomes according to the invention that contain nucleic acids encoded for the antibodies or their fragments and delivered to the blood circulation similarly to the above described therapy of systemic diseases

The antibodies herein mean also antibody derivatives, e.g., also those that consist of a single chain only, truncated, or, based on specificity of the antigen of interest, specially constructed appropriate molecules based on their place of use. Such antibodies and their derivatives and the like are known to those skilled in the art.

The above described immunization, more specifically, when it is conducted with the use of the topical application form has an especial advantage because it is very easy to perform since no highly qualified personnel is required and there is no need in special hygienic places because of the risk of injections. In addition, This advantage is also added by self life of the vaccines containing the liposomes according to the invention, liposomes according to the invention, pharmaceutical compositions according to the invention or medical forms according to the invention. This longer shelf life is based on the fact that no protein-containing material whatsoever, whether it is an antigen for active immunization or antibodies or antibody fragments for passive immunization is used for injection.

Because the vaccine in the narrow sense is formed and finally provided by means of the Langerhans cells, a substantial cost advantage is obtained over production of protein-containing materials that require subsequent purification.

Further advantages and features of the invention will become apparent from the description of the following examples of preparation of the liposomes according to the invention, in which:

Fig. 1 is a freeze fracture electron microscopy (FFEM) of the human stratum corneum lipid liposomes prepared by detergent dialysis;

Fig. 2 is a freeze fracture electron microscopy (FFEM) of the human stratum corneum lipid liposomes prepared by ultrasonic treatment;

Fig. 3 is the NICOMP distribution analysis of the stratum corneum lipid liposomes prepared by ultrasonic treatment with the inverted Laplace transform (bimodal distribution);

Fig. 4 is the NICOMP distribution analysis of the stratum corneum lipid liposomes prepared by detergent dialysis, with the inverted Laplace transform (bimodal distribution);

Fig. 5 is the zeta potential distribution shown by the stratum corneum lipid liposomes prepared by detergent dialysis; and

Fig. 6 shows the result of transfection of the human skin cells With plasmid DNA containing liposomes according to the invention.

7

Example 1

Preparation of the Liposomes According to the Invention

Obtaining the stratum corneum lipids

The cornea layer was enzymatically recovered by trypsination from small skin pieces obtained during a surgical intervention, and the total lipid was extracted by using the modified Bligh & Dyer method [Lasch, J.; J. Liposome Res. 4 (1), 93-106 (1994)]. Alternatively, the roughened sole callus skin was used.

The specimens were extracted in the dark with chloroform/methanol (1 : 1) under intensive shaking in the nitrogen atmosphere. One third of the batch was added the PBS buffer to "salt out" cholesterol sulfate in the organic phase with NaCl. The mixtures was swirled, and phases were separated by centrifugation. The bottom organic phase was collected and dried in N₂.

The lipid composition of the callus stratum corneum was quantified by measuring the areas under the reflection-absorption curves using HPTLC [(Automated Multiple Development HPTLC von CAMAG; Muttenez, Schweiz); Zellmer, S.; Journal of Chromatography B, 691 (1997), 321-329] and calibration with the corresponding lipid on more than 100 test specimens. The staining was done with CuSO₄/ H₃PO₄ in 5-% methanol.

The following Table 1 shows various classes of lipids with their percentage level (average values):

Table 1

Average Levels of Different Lipoid Classes Formed from the Stratum Corneum Lipid, in % by Weight

Lipid class	Average lipid level (% be weight)
Phospholipid	< 2
Cholesterol sulfate	2.06 ± 0.13
Free fatty acids	20.16 ± 1.12
Ceramide	20.25 ± 0.67

Sterol	43.53 \pm 3.04
Triacylglycerol (neutral fat)	4.56 \pm 0.54
Sterol ester	9.44 \pm 0.67

Preparation of the Human Stratum Corneum Lipid Liposomes (hSCLLs)

hSCLLs was prepared by ultrasonic treatment by performing the sonic treatment of the lipid dispersion PBS, pH 7.4, in the Branson Sonifier to transparency, the sonic treatment being conducted at 0.5-minute intervals under cooling with ice water.

hSCLLs was prepared alternatively by using the so-called detergent dilution method. Cholate /lipid mixture micelles were transferred to a special rotary dialyzer (Diachem AG, Lagnau/Zürich) in lipid vesicles.

The results of both methods are shown in Fig. 1 and Fig. 2, wherein Fig. 1 shows a freeze fracture electron microscopy (FFEM) of the

8

hSCLLs that was prepared by detergent dialysis, and Fig. 2 shows a freeze fracture electron microscopy (FFEM) of the hSCLLs that was prepared by ultrasonic treatment.

In both cases the line shown represents 100 nm, and the arrow in circle shows the damping direction.

The hSCLLs was then characterized as regards its size distribution by means of the photon correlation spectroscopy (PCS) with the use of the NICOMP Submicron Particle Sizer, Model 370. The respective results are given in Fig. 3 and Fig. 4, wherein Fig. 3 shows the results for the liposomes prepared by sonic treatment, and Fig. 4 shows the results of the liposomes prepared by detergent dialysis.

It can be seen in Fig. 3 that 74.62% of the liposomes had the diameter of 160.6 nm, and the second substantially smaller fraction of 25.38% of the liposomes had the diameter of 416.7 nm.

When the liposomes were prepared by detergent dialysis, it can be seen in Fig. 4 that there were also two populations of the liposomes, wherein 87.3% of the liposomes had the diameter of 183.5 nm, and the second, also substantially smaller population of 12.7%, had the diameter of 979.7 nm.

In both cases, the above-mentioned were obtained from the raw data under the following conditions: smoothing factor 3, minimum diameter 80 nm, plot size 39, accumulated impulse 8000 K in 30 minutes, count rate 300 Hz.

Fig. 5 shows an estimate of the zeta potential of the hSCLs determined using the Zeta Master Version PCS: v1.2 (Malvern Instruments, England) in the Cell Group Cell Type ZEM010 Cross Beam Mode (Lasch, J.; J. Liposome Res. 5(1), 99-108 (1995).

As can be seen in Fig. 5, the zeta potential of the hSCLs is from -64 to -66 mV. This relatively high negative value can be explained by the cholesterol sulfate level.

The individual different zeta potentials are given with respective intensities in Table 2.

Table 2

Distribution of the zeta potential (mV) of the hSCLs Prepared by Sonic Treatment

Zeta	Intensity	Zeta	Intensity	Zeta	Intensity
- 150.0	0.0	- 83.3	0.0	- 16.7	0.0
- 141.7	0.0	- 75.0	24.2	- 83	0.0
- 133.3	0.0	- 66.7	44.8	0.0	0.0
- 155.0	0.0	- 58.3	31.0	8.3	0.0
- 116.7	0.0	- 50.0	0.0	16.7	0.0
- 108.3	0.0	- 41.7	0.0	25.0	0.0
- 100.0	0.0	- 33.3	0.0	33.3	0.0
- 91.9	0.0	- 25.0	0.0	41.7	0.0

Other methods for characterization of the lipid layer forming the liposome membrane such as, for instance, measurement of the phase transition temperature (T_m) did not yield any results, which can be explained by high cholesterol level in the stratum corneum lipid.

Example 2

Transfection of the Human Skin with the Liposomes According to the Invention Containing Plasmid DNA

9 An appropriate quantity of a lyophilized lipid mixture as added to 50 µg of plasmid DNA, with the lipid mixture being prepared as described in Example 1. The human stratum corneum liposomes containing the plasmid DNA were formed under intensive shaking.

After an appropriate pretreatment step (Menk) and hydrogenation of the stratum corneum with urea MENK (50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 mM K₃PO₄), the above-described liposome mixture containing the plasmid DNA was applied. After incubation for 24 hours at 37° C, skin samples were taken in the epidermal and dermal portions. The epidermal portion was studied in the quantitative test on beta-galactosidase production. After lysis of the epidermis in a lysis buffer with mechanical crushing, 2 ml of the cell extract were mixed with a reaction buffer

(0.035 mmol galactone) chemiluminescence substrate (Tropix Bedford, Massachusetts. After incubation for one hour, emerald luminescence enhancer (Tropix Bedford, Massachusetts) was added, and chemiluminescence was measured in Chemiluminometer (e.g., Monolight 1005, Analytical Luminescence, San Diego, California). The beta-galactosidase specific activity in the epidermal extracts was estimated as the ration of light units to the protein level. The negative control was provided with non-beta-galactosidase expressing plasmid (e.g., vector control DNA) under the identical conditions. Each measurement was performed in duplicate. The number of independent tests is shown for each of the treatment groups in Fig. 6. The absolute values on the beta-galactosidase enzymes can be estimated by comparing the resulting values of the light units with the calibration curve, which was plotted by adding known quantities of the beta-galactosidase enzyme to the beta-galactosidase negative epidermal cell extracts. To summarize, as shown in Fig. 6, there was a high significant rise in the beta-galactosidase marker protein depending on the pretreatment.

An increase in the transfection efficiency or content of the gene product can be achieved within the scope of conventional capabilities of those skilled in the art, e.g., with additional optimizing and pretreatment with other penetration enhancers of the nucleic acid constructs.

The features of the invention that are disclosed in the above description as well as the claims can be used either individually or in any combinations for carrying out the invention in its various embodiments.

Claims

1. A liposome having a lipid phase forming the liposome membrane and an intraliposomal phase enclosed in the lipid phase, **characterized by the fact** that the chemical composition of the lipid phase corresponds to that of the skin layer and that the intraliposomal phase contains at least one compound that is selected from the group consisting of nucleic acids, proteins, carbohydrates, lipids, and low-molecular compounds as well as molecules and structures formed therefrom.
2. The liposome of claim 1, characterized by the fact that the skin layer is the human epidermis.
3. The liposome of claim 1 or 2, characterized by the fact that the skin layer is the stratum corneum.
4. A liposome having a lipid phase forming the liposome membrane and an intraliposomal phase enclosed in the lipid phase, characterized by the fact that the lipid classes corresponding to the liposome contain the following components:

Phospholipid	< 2 % by weight
Cholesterol sulfate	2 by weight
Free fatty acids	20 by weight
Ceramide	20 by weight
Sterol	43 by weight
Triacylglycerol (neutral fat)	4 by weight
Sterol ester	9 by weight

and the intraliposomal phase contains at least one compound that is selected from the group consisting of nucleic acids, proteins, carbohydrates, lipids, and low-molecular compounds, as well as molecules or structures formed therefrom.

5. A method of preparation of liposomes, characterized by comprising

- a) obtaining the stratum corneum lipid and
- b) preparing the liposomes from the stratum corneum lipid by ultrasonic treatment and/or detergent dialysis.

6. The method of claim 5, characterized by the fact that the stratum corneum lipid is obtained by taking the stratum corneum enzymatically and/or mechanically from the skin, with subsequent extraction in methanol-chloroform.

7. A liposome prepared by the method of one of the foregoing claims.

8. The liposome of one of claims 1 through 4 and 7, characterized by the fact that the intraliposomal phase is an aqueous phase.

The liposome of one of claims 1 through 8, characterized by the fact that the compound is selected from the group consisting of growth factors, antibiotics, pain killers, agents that influence cell division and/or vascularization, coagulants and anti-coagulants, cytokines, chemical attractants, enzymes, a and their combinations.

10. The liposome of one of claims 1 through 9, characterized by the fact that the compound is a nucleic acid sequence.

11. A method of transfection of cells, characterized by the fact that the cells being transfected are brought in contact with the liposome of one of the foregoing claims.

12. The method of claim 11, characterized by the fact that the cells being transfected are the skin cells.

13. The method of claim 12 characterized by the fact that the skin cells are selected from the group consisting of skin cells of the stratum corneum, stratum granulosum, and stratum spinosum as well as the keratinocytes.

14. The method of claims 11 through 13, characterized by the fact that the cells are the keratinocytes of the hair follicles.
15. The method of claims 11 through 13, characterized by the fact that the cells are the epidermal Langerhans cells.
16. A pharmaceutical composition containing the liposomes of one of the foregoing claims as well a pharmaceutically acceptable vehicle.
17. A medical for, for topical administration, characterized by containing the liposomes of one of the foregoing claims.
18. The medical form of claim 17, characterized by the fact that the medical form is selected from the group consisting of creams, ointments, gels, spray patches, and tinctures.
19. The medical form of claim 17 or 18, characterized by the fact that it also contains at least one compound selected from the group consisting of a penetration enhancer and a swelling agent.
20. Application of the liposomes of one of the foregoing claims, the pharmaceutical composition or the medical form of any of the foregoing claims for gene therapy of the skin cells.
21. Application of claim 20, characterized by the fact that the skin cells are *in situ*.
22. Application of claim 20, characterized by the fact that the skin cells are *ex vivo*.
23. Application of claims 20 through 22, characterized by the fact that the skin cells are selected from the group consisting of skin cells of the stratum corneum, stratum granulosum, and stratum spinosum as well as the keratinocytes.
24. Application of claims 20 through 23 characterized by the fact that the cells are the keratinocytes of the hair follicles.
25. Application of claims 20 through 24 characterized by the fact that skin cells are the epidermal Langerhans cells.
26. Application of the liposomes of one of the foregoing claims, the pharmaceutical compositions or the medical forms of one of the foregoing claims for the prophylaxis and/or treatment of skin diseases.
27. Application of claim 26, characterized by the fact that the disease is selected from the group consisting of genetic skin diseases, psoriasis, skin tumors, and injuries.

28. Application of claim 27, characterized by the fact that the genetic skin diseases are selected from the group consisting of epidermolysis bullosa simplex, epidermolysis hyperkeratosis, palmoplantar keratosis, junctional epidermolysis bullosa, dystrophic epidermolysis bullosa, lamellar ichthyosis, and xeroderma pigmentosum.

29. Application of the liposomes of one of the foregoing claims and of the pharmaceutical compositions or medical forms of one of the foregoing claims for treatment of warts.

30. Application of the liposomes of one of the foregoing claims and of the pharmaceutical compositions or medical forms of one of the foregoing claims for treatment of systemic diseases.

31. Application of claim 30, characterized by the fact that the systemic disease is selected from the group consisting of hemophilia A and hemophilia B as well as collagen degeneration disorders.

32. Application of the liposomes of one of the foregoing claims and of the pharmaceutical compositions or medical forms of one of the foregoing claims for treatment of alopecia.

33. Application of the liposomes of one of the foregoing claims and of the pharmaceutical compositions or medical forms of one of the foregoing claims for immunizing a host organism.

34. Application of claim 33, characterized by the fact that the host organism is a human body.

35. A vaccine, characterized by the fact that the vaccine contains the liposomes of one of the foregoing claims, wherein the liposomes contain a nucleic acid containing genetic information for an antigen of interest, or contain a nucleic acid that contains genetic information for an antibody or antibody fragment, wherein the antibody or the antibody fragment is specific for the antigen of interest.

Captions:

Fig. 5.

Zeta potential
Intensity

Fig. 6. Transfection of human skin with a liposomal plasmid solution:

pcMV- β Gal/hSCLs (50 μ g/156 μ g)

Student's test comparison with the negative control

Negativekontrolle = negative control

Fig. 1.



Fig. 2

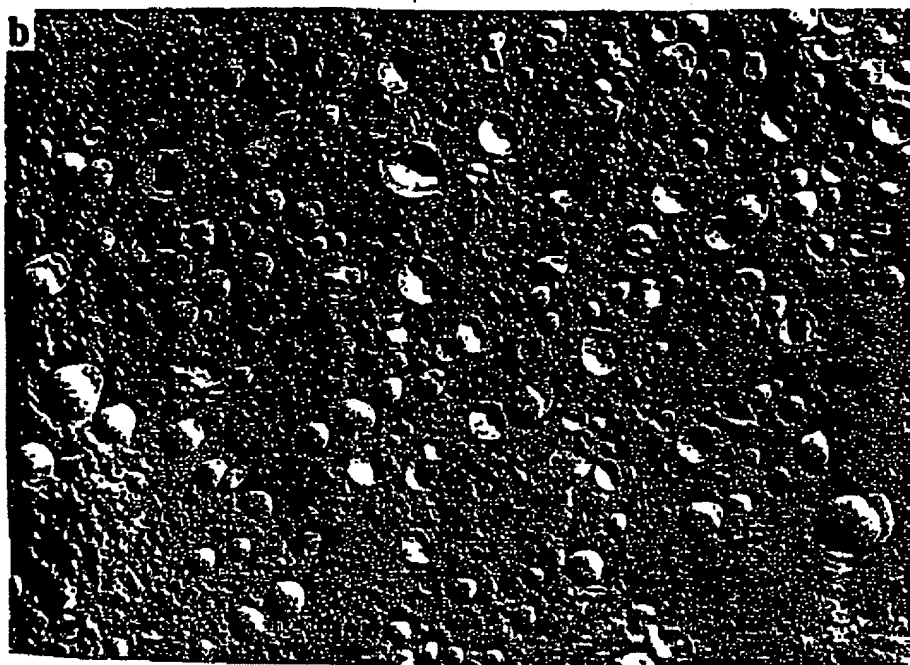


Fig. 3

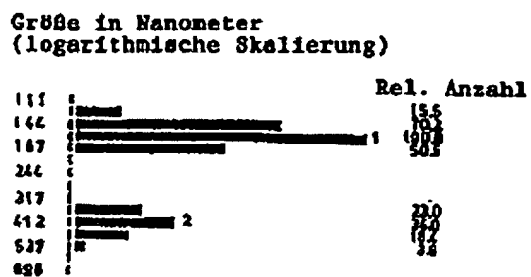


Fig. 4

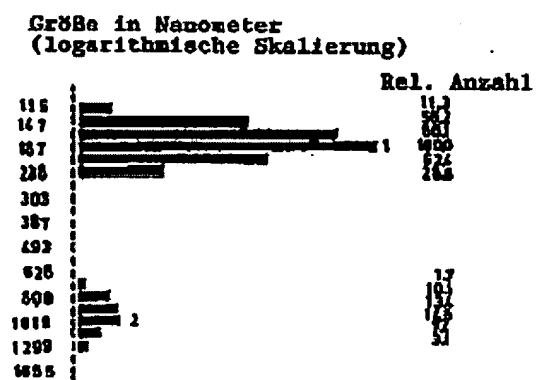


Fig. 5

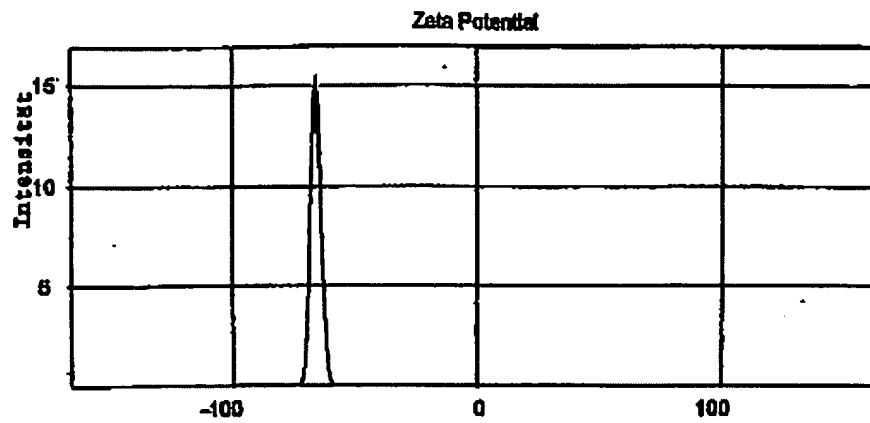
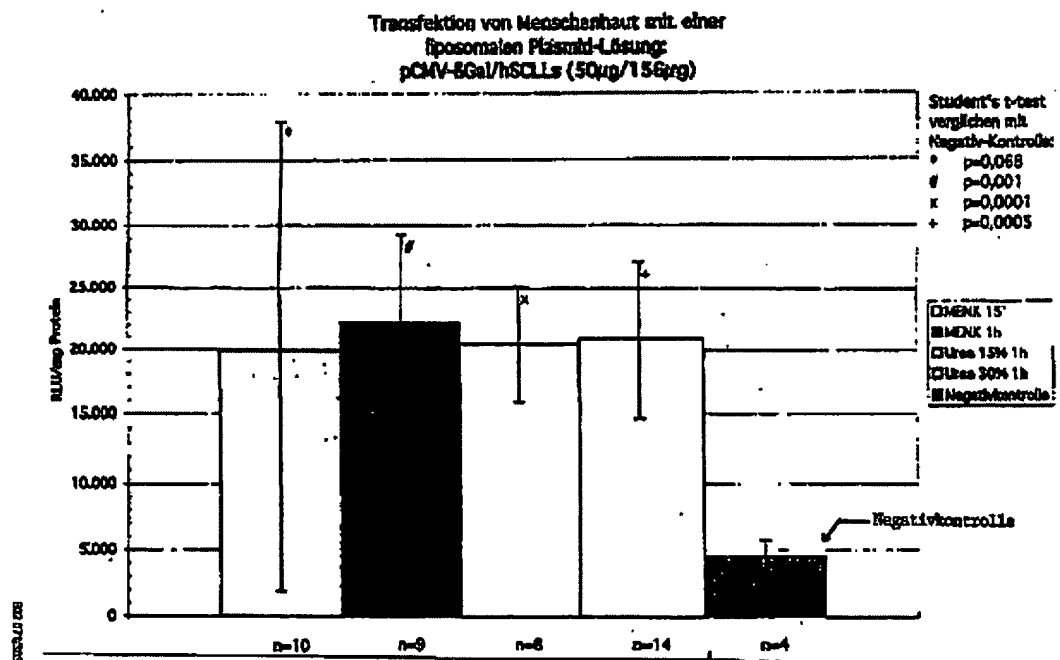


Fig. 6

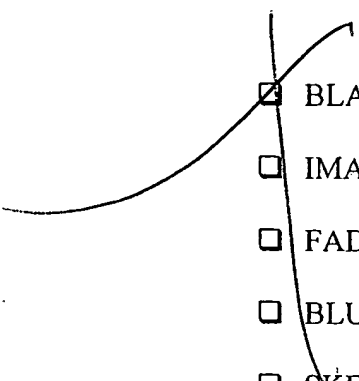


This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- 
- ☒ BLACK BORDERS
 - ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
 - ☐ FADED TEXT OR DRAWING
 - ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
 - ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
 - ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
 - ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
 - ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
 - ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
 - ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**